

Aus dem Georg Speyer Haus
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut
Frankfurt am Main

Funktionelle Analyse von retroviralen SIN Vektoren in T-Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
So Young Ryou
aus Kwangju-si / Südkorea

Frankfurt am Main, 2010

vom Fachbereich Medizin (16) der

Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen am: 08.01.2010

Dekan: Prof. Dr. med. Josef M. Pfeilschifter

Erstgutachter: Prof. Dr. med. D. von Laer

Zweitgutachter: PD. Dr. phil. nat. U. Köhl

Datum der Disputation: 22.04.2010

Für meine Familie

DANKSAGUNGEN

Diese Arbeit wurde von 2007- 2009 am Georg Speyer Haus für chemotherapeutische Forschung in Frankfurt am Main erstellt.

Ich danke allen, die mich bei meiner Doktorarbeit und auch danach unterstützt haben, sodass ich meine Dissertation erfolgreich beenden konnte.

Frau PD. Dr. Ulrike Köhl danke ich herzlich für die schnelle und unkomplizierte Übernahme der Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie mich trotz meines ungewöhnlichen Alters voller Zuversicht als Ihre Doktorandin aufgenommen hat. Sie hat mir viel Mut gemacht und dank ihrer kompetenten Betreuung und ihrem Korrekturlesen habe ich meine Doktorarbeit erfolgreich abschließen können. Für die Themenstellung und sorgfältige wissenschaftliche Unterstützung gilt ein großer Dank.

Janine Kimpel und Dr. Felix Hermann sowie Dr. Sebastian Newrzela danke ich besonders für die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft bei jeder wissenschaftlichen und technischen Fragestellung sowie für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit.

In dankbarer Erinnerung bleiben mir auch Miriam Geist, Patricia Schult-Dietrich und Tefik Merovci für den freundlichen Beistand bei der molekularbiologischen und zellkulturellen Arbeit.

Ji-Hee Yi, Julia Schläger und Elena Sauter möchte ich mich für die nette Begleitung sowohl beim Studium als auch während der Doktorarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie für die uneingeschränkte moralische Unterstützung bei meinem späten Studium und meiner Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Retroviren und HIV	3
2.1.1	Struktureller Aufbau von HIV-1	4
2.1.2	Der Replikationszyklus vom HIV	5
2.2	Chemotherapeutische Ansätze bei der HIV-Infektion	7
2.2.1	Reverse Transkriptase-Inhibitor	8
2.2.2	Protease-Inhibitor	8
2.2.3	Integrase-Inhibitor	9
2.2.4	Eintrittsinhibitor	9
2.2.4.1	CD4–gp120-Inhibitor	9
2.2.4.2	Co-Rezeptor-Antagonist	9
2.2.4.3	Fusionsinhibitor	10
2.3	Gentherapie als modernes Therapiekonzept der HIV-Infektion	11
2.3.1	Retrovirale Vektoren für die Gentherapie	13
2.3.2	Der gammaretrovirale Vektor M87o als Fusionsinhibitor in der Gentherapie der HIV-Infektion	15
2.3.3	SIN Vektoren	16
2.3.3.1	Anwendungen von USE des SV40 und wPRE des Woodchuck-Hepatitis-Virus	18
2.3.3.2	Virale interne Promotoren gegenüber zellulären internen Promotoren	18
2.3.3.3	Vektorelemente, Insulator HS4 und SAR (MAR)	19
2.4	Zielsetzung und Aufgabenstellung der Arbeit	21
3	MATERIAL	23
3.1	Laborchemikalien	23

3.2	Lösungen, Puffer und Kulturmedien	24
3.3	Antikörper	26
3.4	Material für Zellkulturarbeiten	27
3.4.1	Medien und Zusätze	27
3.4.2	Zellen und Anzuchtmedien	27
3.5	Material für molekularbiologische Arbeiten	28
3.5.1	Bakterien	28
3.5.2	Plasmide.....	28
3.5.3	Retrovirale Vektoren und SIN Vektoren.....	29
3.5.4	Enzyme und DNA Größenstandards	29
3.5.5	Durchflusszytometrie- Beads.....	30
3.6	Geräte und Labormaterial	30
3.6.1	Geräte	30
3.6.2	Labormaterial.....	31
3.7	Kits.....	32
3.8	Materialien für Tierexperimente	33
3.8.1	Mausstämme und Haltungsbedingungen	33
3.8.2	Tierexperimentelle Materialien.....	33
4	METHODEN	35
4.1	Transformation der Escherichia coli	35
4.1.1	Kultivierung und Herstellung chemisch kompetenter E. coli	35
4.1.2	Transformation chemisch kompetenter E. coli.....	35
4.1.3	Lagerung von E. coli.....	36
4.2	Molekularbiologische Methoden	36
4.2.1	Isolierung der Plasmid-DNA aus E. coli	36
4.2.2	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	36
4.2.3	Gelelektrophorese von DNA.....	37

4.3	Methoden der Zellkultur	37
4.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	37
4.3.2	Kultivierung von Zellen	38
4.3.3	Isolierung von PBMC aus Blut und anschließende Stimulierung	38
4.3.4	Isolierung von murinen Lymphozyten und anschließende Stimulierung	39
4.3.5	Transiente Transfektion zur Herstellung gammaretroviraler Vektoren.....	40
4.3.6	Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Vektoren und Titration	42
4.3.7	Transduktion auf mit Retronektin beschichteten Platten.....	43
4.3.8	Durchflusszytometrie	43
4.4	Tierexperimentelle Methoden	44
4.4.1	Tierhaltungsbedingungen	44
4.4.2	Transplantation von Mäusen mit hämatopoietischen Zellen.....	44
4.4.3	Blutentnahme und Färbung für FACS	45
4.4.4	Tötung und Sektion der Tiere	45
5	ERGEBNISSE	47
5.1	Übersicht der SIN Vektoren	47
5.2	Test der SIN Vektoren in der Zelllinie PM-1	48
5.2.1	Bestimmung des Virustiters	48
5.2.2	Expressionsstärke der SIN Vektoren in humanen Zelllinien	49
5.3	Langzeitexpression der SIN Vektoren in primären humanen T-Zellen	50
5.4	Expression der SIN Vektoren in vivo im syngenesischen Mausmodell.....	54
5.4.1	Transduktion der Mauszelllinie SC-1	54
5.4.2	Bestimmung der Expression des Transgens in primären murinen T-Zellen	55
5.5	Transplantation der transduzierten primären Maus T-Zellen in Rag 1 Knockout Mäusen.....	57
5.5.1	Entwicklung der Expression von C46 in vivo über einen Zeitraum von 60 Tagen nach der Transplantation.....	57

5.5.2	Transgenexpression am Tag der Endanalyse	59
6	DISKUSSION	62
6.1	SIN Konfiguration mit maC46	62
6.2	Die SIN Konfiguration beeinflusst den Titer nicht stark.....	63
6.3	Expressionsstärke bei SIN Vektoren im Vergleich zum LTR-getriggerten Vektor	64
6.4	Vergleich vom zellulären- und viralen-internen Promotor	64
6.5	Einfluss vom Insulatorelement cHS4, SAR gegen Silencing der Genexpression.....	65
6.6	Langzeitexpression in vitro und in vivo	66
6.7	Ausblick	67
7	ANHANG.....	69
7.1	Literaturverzeichnis	69
7.2	Abkürzungsverzeichnis	77
7.3	Abbildungsverzeichnis	81
7.4	Plasmidenkarten.....	82
8	SUMMARY	88
	LEBENS LAUF	88
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	91

1 Zusammenfassung

Für eine erfolgreiche Gentherapie ist zunächst ein effizientes Gentransfersystem nötig, das das Transgen in möglichst vielen Zellen einbaut und es aktiv hält. Damit sich dann der Anteil der geschützten Zellen vergrößert, muss eine Selektivität der genmodifizierten Zellen gegenüber den nativen Zellen gegeben sein, wobei die Sicherheit nicht außer Acht gelassen werden darf, da ein ungünstiger Einbau des Transgens eine Insertionsmutagenese und somit Tumoren induzieren kann.

Der durch die Arbeitsgruppe von Laer entwickelte retrovirale Vektor M87o codiert den membranständigen Fusionsinhibitor maC46 (membran-anchored C-Peptid 46), der den Eintritt von HIV (Human Immunodeficiency Virus) in die Zielzelle effektiv verhindert. Diese Gentherapie mit M87o wurde in einer klinischen Studie an T-Lymphozyten von 10 weit fortgeschrittenen AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)-Patienten durchgeführt, wobei die Therapie gut verträglich war und keine Toxizität zeigte. Allerdings hatten die Patienten auch keinen klaren Vorteil von der Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden SIN Vektoren (Self-inactivating Vektoren) in 5 verschiedenen Konstruktionen getestet, um die optimale Vektordesign zu ermitteln und eine langfristige hohe Expression zu ermöglichen. Da die SIN Vektoren im Vergleich zu konventionellen gammaretroviralen Vektoren ein geringeres Risiko bezüglich der Insertionsmutagenese aufweisen, stellen sie ein sichereres Vektorsystem dar. Um eine bessere Transgenexpression zu erzielen, wurde in den SIN Vektoren entweder ein zellulärer Promotor oder ein viraler SFFV (spleen focus forming virus) als internen Promotor verwendet. Zusätzliche regulatorische Elemente, wie wPRE (Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element), cHS4 (chicken Hypersensitive Site) Insulator und SAR (Scaffold Attachment Region) Element wurden dann in unterschiedlichen Kombinationen zu stärkeren und langanhaltenden Expressionen integriert, wobei wPRE die RNA Prozessierung verbessert und somit die RNA Stabilität erhöht und SAR und cHS4 Insulator dem Silencing entgegenwirken und so die Expression aufrechterhalten.

Diese fünf SIN Konfigurationen wurden untereinander und mit dem klassischen gammaretroviralen Vektor M87o bezüglich des Titors, der Expressionsstärke und der

Langzeit-Genexpression verglichen. Dazu wurden zunächst humane T-Zelllinien PM-1 und primäre humane T-Zellen als Testzellen verwendet. Die Versuche wurden dann mit murinen T-Zellen wiederholt, die in die immundefiziten Mäuse transplantiert wurden, um die Genexpression in vivo weiter zu verfolgen.

Die SIN Konstrukte zeigten jedoch eine deutlich schwächere Expression als die LTR (Long Terminal Repeat)-getriebene Vektoren und nur ein Konstrukt mit dem viralen Promotor und wPRE zeigte eine annähernd so hohe Expression wie die konventionellen Vektoren. Während der virale SFFV Promotor eine höhere Expressionsstärke gegenüber dem zellulären EF1 α (Elongationsfaktor 1 alpha) Promotor zeigte, hatte der cHS4 Insulator nur geringfügige Einflüsse sowohl auf den Titer als auch auf die Expressionsstärke. Der Vektor mit dem SAR-Element zeigte zwar die geringsten Titer und Expressionsstärke, aber in Langzeitbeobachtung wies er sowohl in vitro als auch in vivo eine relativ konstante Anzahl von transgenpositiven Zellen auf.

SIN Vektoren, in denen mit einer Kombination von wPRE und SAR-Element die RNA Prozessierung verbessert und das methylationsbedingte Silencing verhindert wird, könnten eine weitere Optimierungsmöglichkeit des Gentransfersystems bei der Gentherapie darstellen.

2 Einleitung

2.1 Retroviren und HIV

1970 entdeckten Howard M. Temin und S. Mituzami sowie David Baltimore (Baltimore 1995) ein neues Enzym, die Reverse Transkriptase der Retroviren, das RNA in doppelsträngigen DNA umschreiben kann.

1980 beschrieb der amerikanische Virologe Robert C. Gallo als Erster das Human-Pathogene Retrovirus, HTLV (Humanes T-Zell Leukämie- Virus), das bei einem erwachsenen Menschen eine T-Zell Leukämie verursachen kann (Poiesz, Ruscetti et al. 1980). Im folgenden Jahr wurden die humanen Immundefizienzviren HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) und HIV-2 (Montagnier 2002) als Retroviren und Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert (Gottlieb, Schroff et al. 1981; Gallo, Sarin et al. 1983; Karpas 2004).



Abbildung 2.1 Epidemie der HIV-Infektion 2007, Die Anzahl der Erwachsenen und Kinder, die an HIV infiziert sind, waren im Jahr 2007: Total 33.2 Millionen

http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf (WHO)

Als Human-Pathogene Retroviren sind bis jetzt Viren der Gattung Delta-Retrovirus (HTLV I und II) und der Gattung Lentivirus (HIV-1 und -2) bekannt. HIV-2 ist ein naher Verwandter des affenspezifischen simian immunodeficiency virus (SIV) (Korber, Muldoon et al. 2000). Während HIV-2 Infektionen im Wesentlichen in Westafrika zu finden sind, ist HIV-1 weltweit verbreitet. HIV-Infektionen sind verantwortlich für die erworbene Immunschwäche AIDS (acquired immunodeficiency syndrome).

Im Dezember 2007 waren etwa 33,2 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert, davon wurden etwa 2,5 Millionen Menschen im Jahr 2007 neu infiziert. 2,1 Millionen Menschen starben an den Folgen von AIDS (Abbildung 2.1 Unaid/WHO „AIDS Epidemic Updates: december 2007“).

2.1.1 Struktureller Aufbau von HIV-1

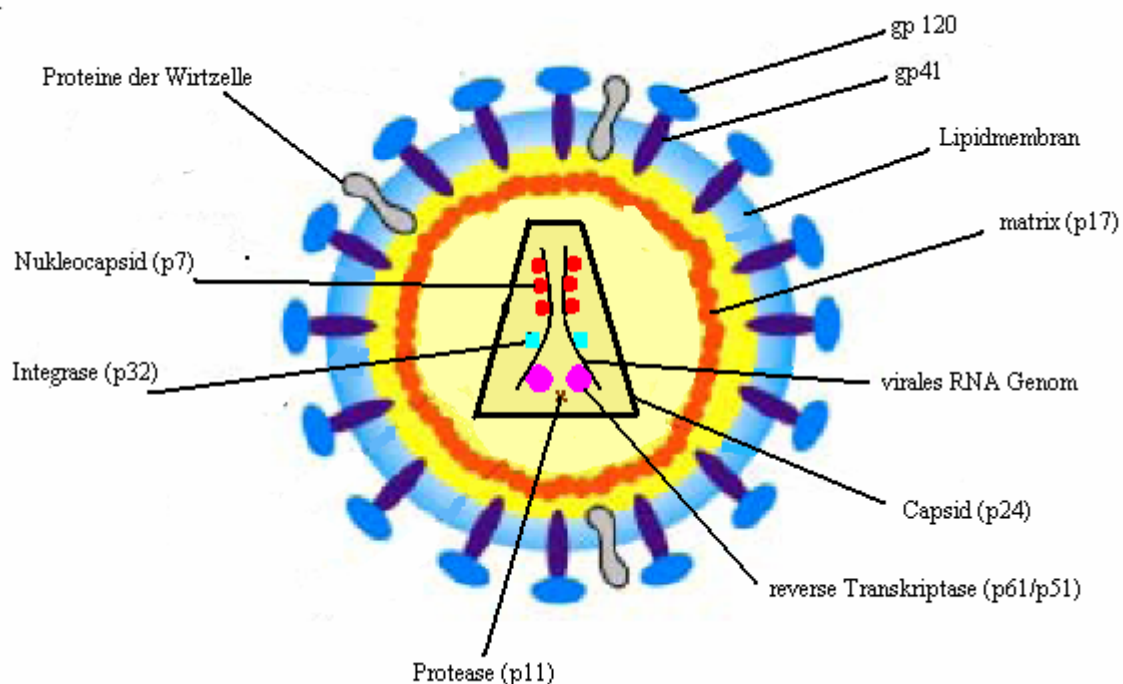
HIV-1 gehört zur Gattung der Lentiviren. Ein infektiöses HIV-1 Partikel hat einen Durchmesser von etwa 100nm und besitzt ein konisches Capsid im Inneren. Um das Capsid befindet sich eine Hüllmembran, die von der Zellmembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Die viralen Hüllproteine, bestehend aus transmembranem gp120 und externem gp41 (glycoprotein), befinden sich als Trimere in der Hüllmembran. Die Innenseite der Membran ist mit einer Schicht mit Matrixproteinen ausgekleidet (MA, p17).

Das Capsid besteht aus den Capsidproteinen (CA, p24) und enthält zwei einzelsträngige virale RNA-Genome, die mit den Nukleocapsidproteinen (NC, p7) verbunden sind. Im Capsid liegen außerdem die wichtigen viralen Enzyme für die virale Replikation vor, und zwar die Reverse Transkriptase (RT, p51/66), die Protease (PR, p11) und die Integrase (IN, p32).

Das Genom von HIV ist etwa 9,8 kb groß und weist alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf, wie die lineare Gliederung von 5' Cap Struktur und 3' Polyadenylierung. Es kodiert insgesamt 15 Proteine (Frankel and Young 1998). Neben den für alle Retroviren typischen Proteinen Gag (gruppenspezifische Antigen, innere Strukturproteine), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Envelope, Hüllprotein) gibt es für die Steuerung viraler Genexpression wichtige regulatorische Proteine, wie Rev und Tat und außerdem vier weitere akzessorische Proteine (Vif, Vpr, Vpu und Nef), die

für die virale Replikation notwendig sind (Vogt and Hu 1977; Haseltine 1991; Costin 2007).

A



B

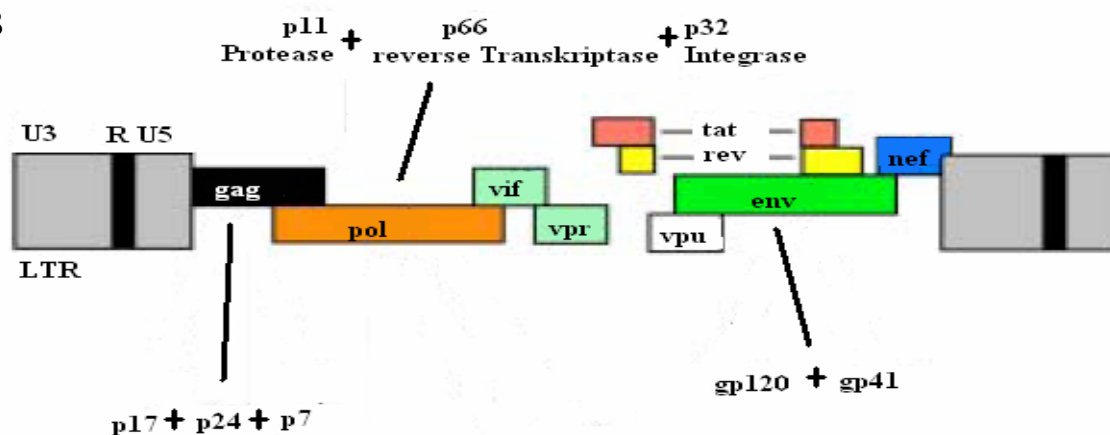


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Struktur von HIV(A) (Gelderblom 1991) und des Genoms(B) (Wong-Staal 1991)

2.1.2 Der Replikationszyklus vom HIV

Der Replikationszyklus von HIV-1 fängt mit dem Kontakt des Virus an einer Zielzelle an. Der zelluläre Reaktionspartner hierfür ist das CD4-Molekül (Cluster Determinante), das auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Makrophagen und Monozyten vorhanden

ist, sowie CXCR4 oder CCR5 (Chemokin Rezeptoren), die Mitglieder der Chemokin-Rezeptorengruppe sind und als Co-Rezeptoren bei dem Eintritt von HIV in die Zielzelle dienen (Deng, Liu et al. 1996; Dragic, Litwin et al. 1996; Chen, Zhou et al. 1997; Klasse, Rosenkilde et al. 1999; Chazal and Gerlier 2003).

HIV bindet über das Hüllprotein gp 120, das als trimere Komplex vorliegt, mit hoher Affinität an CD4 und an einen der Co-Rezeptoren. Nach der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung im gp 120 (Gallo, Finnegan et al. 2003; Huang, Lam et al. 2007). Die dadurch bedingte Einlagerung von gp41 in die Zellmembran der Zielzelle führt zu einer Verschmelzung dieser mit der Virushülle. Nach der Fusion wird das virale Nukleocapsid in das Zytoplasma freigesetzt.

Im Zytoplasma wird die virale RNA mithilfe der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Dabei liegt die DNA zunächst als ein mit Proteinen assoziierter Präintegrationskomplex vor und wird nach Erreichen des Zellkerns durch die virale Integrase in das Wirtsgenom integriert (Schröder, Shinn et al. 2002). Das integrierte Provirus dient als funktionelle Expressionseinheit und wird von den terminalen Wiederholungseinheiten (LTR, long terminal repeat) flankiert (Cheng-Mayer, Seto et al. 1988). Die 5'LTR dient als Promotor und die 3'LTR enthält das Polyadenylierungssignal (Pereira, Bentley et al. 2000). Das integrierte Provirus wird nun in mRNA transkribiert und wird nach mehrfachen Spleißvorgängen zur Proteinsynthese in das Zytoplasma transportiert. Die Synthese der viralen Glykoproteine Env findet an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Die Env Proteine werden dann als membranständiges Protein zur Zellmembran transportiert.

Das ungespleißte Primärtranskript des kompletten Virus dient als virale genomische RNA und mRNA für die viralen Gag- und Pol-Proteine. Diese Polyproteine werden an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und zur Herstellung der infektiösen Virionen an die Zellmembran gebracht. Nun werden lediglich die viralen RNA Moleküle, die Verpackungssignale tragen, mit den Gag- und Pol-Proteinen in das infektiöse Partikel aufgenommen. Das neue Virus wird an der Zellmembran durch Knospenbildung freigesetzt. Anschließend erfolgen weitere extrazelluläre Reifungsprozesse durch enzymatische Spaltung der Gag- und Pol-Proteine (Coffin, Hughes et al. 1997), wobei die Matrix-, Capsid-, Nucleocapsid- und Link-Proteine sowie Reverse Transkriptase

und Integrase entstehen. Das neue reife Virus kann nun die nächste Zielzelle infizieren.

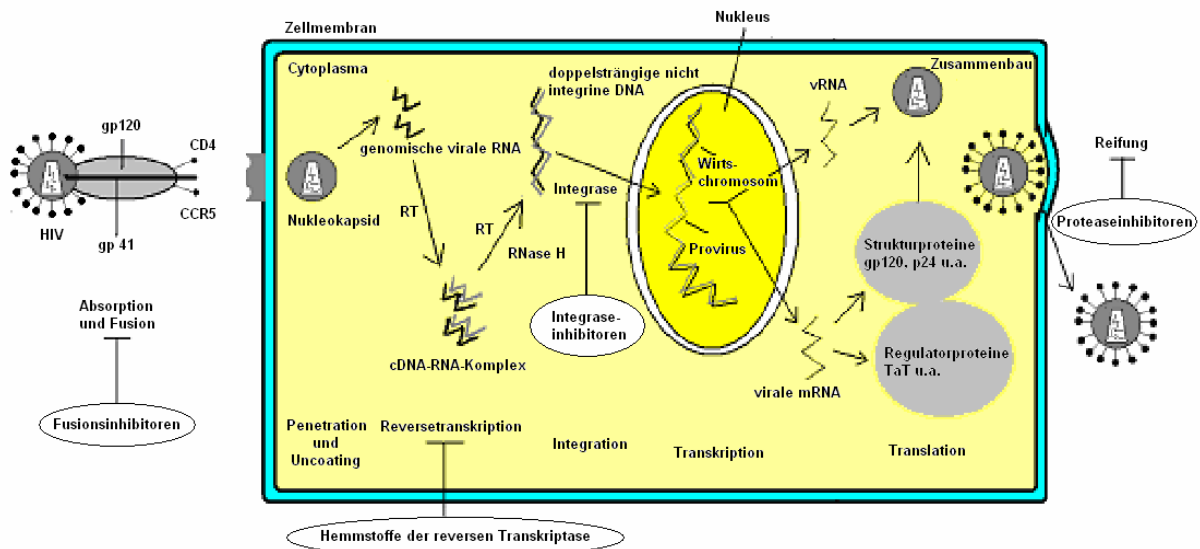


Abbildung 2.3 Replikationszyklus des Retrovirus HIV-1 und Wirkort der wichtigen Medikamentengruppen (Forth, Henschler et al. 10.Aufl. 2009).

2.2 Chemotherapeutische Ansätze bei der HIV-Infektion

Die wichtigen Angriffspunkte der antiviralen Chemotherapeutika sind die drei virusspezifischen Enzyme, die Reverse Transkriptase, die Protease und die Integrase. Ein weiterer Wirkstoff sind die Blocker des Viruseintritts in die Zelle, z.B. Fusionsinhibitoren wie T-20.

Mithilfe der antiviralen Therapie wurde die Lebenserwartung der Patienten zwar deutlich verlängert, aber unerwünschte Nebenwirkungen der Medikamente und die Bildung von resistenten Virusmutanten limitieren noch immer die Therapie.

Um eine rasche Resistenzentwicklung zu verhindern, hat sich die sogenannte hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) durchgesetzt. Durch kombiniertes Einsetzen von drei bis vier unterschiedlichen Medikamenten wird die Resistenzbildung effektiv gehemmt. Für den Therapieerfolg durch die Medikamente wird geprüft, ob diese effektiv die Viruslast senken, sodass sich das Immunsystem der Patienten wieder rekonstruieren kann. Dafür ist eine langzeitige ausreichende Serumkonzentration der Medikamente notwendig. Die langfristige Medikamenteneinnahme verursacht jedoch Nebenwirkungen, wie die Erhöhung des

cardiovaskulären Risikos und die Entstehung der peripheren Lipodystrophie sowie Diabetes Mellitus oder Neurotoxizität (Holstein, Plaschke et al. 2001; Barbaro 2008)

2.2.1 Reverse Transkriptase-Inhibitor

Reverse Transkriptase-Inhibitoren werden zum einen in die Nukleosid-Analoga und zum anderen in die Klasse der Nicht-Nukleosid-Analoga unterteilt. Nukleosid-Analoga haben einen modifizierten Zuckeranteil, sodass es nach dem Einbau in den DNA-Strang durch die Reverse Transkriptase zum Strangabbruch und zur Blockade der viralen Replikation kommt (Arts and Wainberg 1996; Sahlberg, Noreen et al. 1998). Als Beispiel dafür sind einige der ältesten HIV Arzneimittel, wie Zidovudin, Stavudin und Lamivudin, zu nennen. Manche Nukleosid-Analoga, wie Tenofovir, das sich von Adenin ableitet, haben eine Phosphat-Gruppe im Molekül und verhindern dadurch ihre Umwandlung in ein für die DNA-Synthese notwendiges Monophosphat (De Clercq 2009).

Die Nicht-Nukleosid-Analoga besitzen Strukturen, die sich von den Nukleotiden deutlich unterscheiden. Sie binden direkt an die benachbarte Region des katalytischen Zentrums der Reversen Transkriptase und verursachen eine allosterische Hemmung des Enzyms (De Clercq 2009). Beispiele dafür sind die Arzneimittel Delavirdin, Nevirapin und Efavirenz.

2.2.2 Protease-Inhibitor

Die HIV-Protease ist ein von der viralen RNA kodiertes Enzym und spielt für die Bildung von infektiösen Viren eine entscheidende Rolle, weil sie das Vorläuferprotein katalytisch in für die virale Replikation notwendigen Proteinen schneidet. HIV-Protease-Inhibitoren blockieren spezifisch die Bildung funktionell aktiver viraler Proteine und sind ein wichtiger Bestandteil für die aktive antivirale Kombinationstherapie gegen die HIV-Infektion (Barbaro 2006). Saquinavir, Indinavir, und Ritonavir gehören zu dieser Arzneimittelgruppe.

2.2.3 Integrase-Inhibitor

Die Integrase-Inhibitoren gehören einer neuen Klasse von antiretroviralen Substanzen an, welche die Aktivität der viralen Integrase hemmen. Die HIV-Integrase ist ein Enzym, das für den Einbau der viralen Erbinformationen in die DNA der Wirtszellen verantwortlich ist. In einer Studie von Grinsztejn et al., 2007 wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit des Integrase-Inhibitors Raltegravir (MK-0518) in der Therapie von Patienten mit mehrfach resistenten Viren nachgewiesen (Grinsztejn, Nguyen et al. 2007; Markowitz, Nguyen et al. 2007).

2.2.4 Eintrittsinhibitor

Zu den Eintrittsinhibitoren gehören die folgenden drei Gruppen (Briz, Poveda et al. 2006; Copeland 2006).

2.2.4.1 CD4–gp120-Inhibitor (Rusconi, Scozzafava et al. 2007)

CD4-gp120-Inhibitoren verhindern die Bindung des Virus an den CD4-Rezeptor auf verschiedene Weisen. Substanzen dieser Kategorie sind in der Entwicklung und manche davon werden schon in klinischen Studien geprüft. Ein Beispiel ist PRO-542. Es ist ein „tetraivalentes“ rekombinantes antikörperähnliches Fusionsprotein, das den CD4-Rezeptor nachahmt (Jacobson, Israel et al. 2004). Ein weiterer Wirkstoff dieser Klasse ist der Anti-CD4-Antikörper TNX-355, der die Bindung zwischen des HIV-gp120 und CD4 kompetitiv hemmt (Kuritzkes, Jacobson et al. 2004).

Ein anderer Inhibitor, BMS-806 hemmt die Konformationsänderung nach der CD4 Bindung und CADA (cyclotriazadisulfonamide) verringert die Expression von CD4 auf der Zelloberfläche (Vermeire, Brouwers et al. 2008). Da die Wirkungsmechanismen dieser Inhibitoren verschiedene Angriffspunkte haben, ist die Gefahr einer Kreuzresistenz gering.

2.2.4.2 Co-Rezeptor-Antagonist

Außer der Bindung an CD4 ist die Bindung an einen Chemokin-Rezeptor eine notwendige Bedingung für den HIV-Eintritt. Hauptsächlich sind es CCR5 und CXCR4,

deren Antagonisten sich je nach Größe in drei Gruppen unterscheiden. Die meisten der CCR5-Antagonisten sind kleine Moleküle, die die Interaktion zwischen gp120 und CCR5 verhindern, indem diese wie Chemokine an die Co-Rezeptoren binden. Mehrere Stoffe dieser Substanzengruppe haben verschiedene molekulare Strukturen und binden auch an verschiedenen Regionen in CCR5.

Als erster selektiver CCR5 Rezeptor-Inhibitor wurde Maraviroc in Deutschland 2007 für HIV Therapie zugelassen. Dieses oral verfügbare Medikament dient zur Kombinationstherapie bei nachweisbaren R5-Viren (Gulick, Lalezari et al. 2008).

2.2.4.3 Fusionsinhibitor

Nach der Bindung an den Chemokin-Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung von gp 41. Das Fusionspeptid von gp41 wird in die Zellmembran insertiert. Gp 41 erfährt dann weitere strukturelle Umorganisationen, welche eine Interaktion zwischen den Heptad-Repeat-Regionen HR1 und HR2 verursachen. Diese bilden eine thermostabile, Sechshelix-Bündel-Struktur, welche für die Membranfusion wichtig ist. Die bei der Bildung des Sechshelix-Bündels frei werdende Energie wird für die Fusion verbraucht. Fusionsinhibitoren werden von HR1 oder HR2 abgeleitet, und man bezeichnet sie als N-Peptid bzw. C-Peptid. Enfuvirtide (T-20) oder T-1249 gehören zu den C-Peptiden (Kilby, Hopkins et al. 1998). T-20 (Enfuvirtide) ist ein wichtiger Wirkstoff der Kombinationstherapie gegen die HIV-Infektion. Der aus 36 Aminosäuren bestehende Fusionsinhibitor wurde schon im Jahr 2003 zugelassen. Das lösliche Peptid T-20 hat aber eine sehr kurze Halbwertszeit von 3 Stunden im Serum, sodass es sehr hohe Therapiekosten mit sich bringt. Darüber hinaus kann das Medikament nicht oral angewendet werden, sondern muss subkutan injiziert werden. Es wurde auch eine schnelle Resistenzbildung von HIV gegen T-20 beschrieben (Wei, Decker et al. 2002).

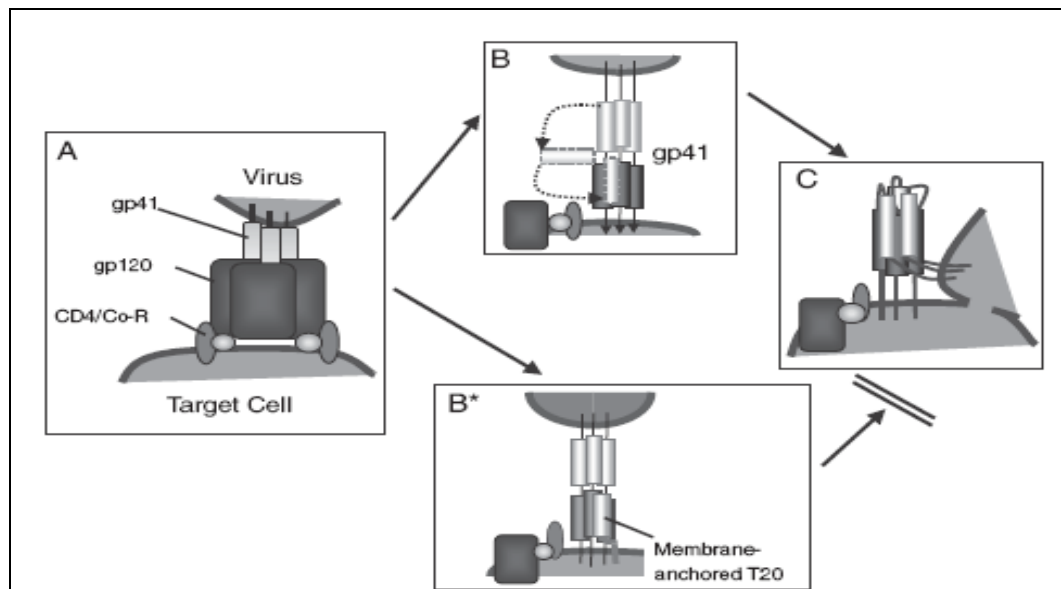


Abbildung 2.4 Fusionsprozess und C-Peptidaktion

Inhibition vom Viruseintritt durch M87o. Das Hüllprotein besteht aus einer Transmembranuntereinheit (TM, gp41), die nicht kovalent mit Oberflächeneinheiten (SU, gp120) verbunden ist. Gp41 verbindet diese mit der Virusmembran. Wenn gp120 an CD4-Rezeptor und Chemokin Rezeptor bindet, kommt es zur Konformationsänderung. (A) gp41 verursacht Fusion von Virus- und Zellmembran. (B-C) gp41 hat zwei alpha helikale heptad repeat Region. Drei N-terminale Helices bilden eine zentrale coiled-coil Struktur und C-Terminale Helices ist darin enthalten. (B) Membran verankerte Peptide (C-Peptid, M87), die sich von c-terminale heptad repeat ableiten, binden an n-terminale coiled-coil Struktur von HIV gp41 und führt zum fusionsinkompetenten Zustand. (Abbildung aus von Laer 2001)*

2.3 Gentherapie als modernes Therapiekonzept der HIV-Infektion

Nach der Einführung von HAART wurde die Überlebenschance der HIV Patienten deutlich verlängert. Doch aufgrund der schnellen Resistenzbildung der HIV-Stämme und der starken Nebenwirkungen der chemotherapeutischen Behandlung ist die Therapie aber immer noch eingeschränkt. Hier stellt die Gentherapie eine Alternative zur konventionellen antiviralen Therapie dar (von Laer 2001).

Die Gentherapie gegen die HIV-Infektion (Buchsacher and Wong-Staal 2000) hat zwei grundsätzliche Strategien. Zum einen können die infizierten Zellen spezifisch eliminiert und damit die virale Replikation gehemmt werden. Erreicht wird dies

beispielsweise durch HIV-tat induzierte Expression von Suizidgenen oder Kaspasen, die spezifisch von der HIV-Protease aktiviert werden und Apoptose hervorrufen (Caruso, Salomon et al. 1995; Vocero-Akbani, Heyden et al. 1999). Einige Versuche zielen auch auf die immungesteuerte Elimination der Zellen. Für diese Strategie gilt: Je schneller die infizierten Zellen eliminiert werden, desto weniger Viren werden produziert.

Zum anderen gibt es die Möglichkeit der sogenannten „intrazellulären Immunisierung“ (Baltimore 1988), wobei das antivirale Gen in die Zielzelle vom HIV eingeschleust und dort exprimiert wird (von Laer and Brandenburg 2001). Die Zielzellen sind durch die antiviralen Proteine, die sie nun selbst produzieren, vor HIV geschützt. Dadurch können die HIV-Replikationen gehemmt werden und die Anzahl der CD4+ T-Zellen kann sich normalisieren.

Ein Problem dieser Strategie ist, dass die Anzahl der Zielzelle vom HIV im menschlichen Körper sehr groß ist, etwa 10^{11} , wodurch die genetische Modifikation der kompletten Zellpopulation nicht möglich ist. Deshalb ist für die Effektivität der „intrazellulären Immunisierung“ ein selektiver Vorteil der genetisch modifizierten Zelle gegenüber der nicht modifizierten Zelle notwendig, damit die geschützten Zellen sich über die Zeit ansammeln können.

Die antiviralen Gene zur intrazellulären Immunisierung kann man nach ihren Wirkungen in drei Klassen einteilen. Die Gene der Klasse I hemmen die virale Replikation in der frühen Phase einschließlich der Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Beispiele sind das membranständige Peptid maC46, das den Fusionsvorgang von Virionen mit der Zellmembran blockiert, und intrazelluläre single-chain-Antikörper gegen die Reverse Transkriptase (Shaheen, Duan et al. 1996) und Integrase (Kitamura, Ishikawa et al. 1999). Die Gene der Klasse II hemmen die Expression der viralen Proteine nach der Integration, z. B. Tat Rybozyme (Fraisier, Irvine et al. 1998), RRE decoys (Bahner, Kearns et al. 1996) und anti-sense-RNA (Mautino and Morgan 2000). Sie unterdrücken die durch HIV-Infektion ausgelösten zytopathischen Effekte und die Zellen werden schwerer von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt. Die Gene der Klasse III reduzieren die Anzahl der infektiösen Virionen direkt, verhindern aber nicht den Zelltod durch zytopathische Effekte der Viren oder durch die zytotoxischen T-Lymphozyten, z.B. alpha 1 antitrypsin, das die Prozessierung der HIV Proproteine blockiert (Cordelier and Strayer 2003).

Die Gentherapie gegen HIV nutzt entweder die T-Helferzelle oder hämatopoetische Stammzelle als Zielzelle (Anderson, Bandi et al. 2006; Schambach, Schiedlmeier et al. 2006). Letztere haben große Vorteile. Sie besitzen eine hohe Regenerationskapazität, wodurch auch das T-Zell-Repertoire regeneriert wird. Zusätzlich sind auch die Monozyten sowie Makrophagen geschützt. Ein prinzipielles Problem einer auf Stammzellen basierten Gentherapie ist aber, dass eine Konditionierung des Patienten für ein gutes Anwachsen der modifizierten Zellen notwendig ist. Außerdem existiert die Gefahr der Insertionsmutagenese bei Benutzung von gammaretroviralen Vektoren (Modlich, Kustikova et al. 2005).

Der Erfolg der Gentherapie gegen die HIV-Infektion hängt von drei wichtigen Elementen ab:

1. Es muss ein Gentransfersystem angewandt werden, das einen hoch effizienten Gentransfer ohne Funktionsverluste der genmodifizierten Zellen erlaubt.
2. Die genmodifizierten Zellen müssen einen selektiven Vorteil gegenüber nativen Zellen haben.
3. Zuletzt müssen antivirale Gene vorsichtig auf mögliche Toxizität, Immunogenität und Nebeneffekte sowie auf mögliche Resistenzbildung überprüft werden (von Laer, Hasselmann et al. 2006).

2.3.1 Retrovirale Vektoren für die Gentherapie

Virale Vektoren der Gentherapie leiten sich häufig von den Gammaretroviren (Miller, Miller et al. 1993; Schweizer, Flory et al. 2001), vor allem den Murinen Leukämieviren (MLV), oder von Lentiviren (Naldini, Blomer et al. 1996) ab, und wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt. Retroviren eignen sich als Gentransfersysteme für die Gentherapie, da sie sich stabil in das Wirtszell-Genom integrieren (Baum, Dullmann et al. 2003) und ihre Strukturgene und die regulatorischen cis-Elemente voneinander getrennt werden können. In retroviralen Gentherapievektoren werden die retroviralen Strukturgene durch die therapeutischen Gene ersetzt, wobei diese bis zu 10 kb groß sein können. Der retrovirale Vektor besteht also aus 3'- und 5'-LTR, die R und U5-Region beinhaltet, aus der Primerbindungsstelle (PBS), dem Splice Donor (SD) und dem therapeutischen Gen sowie dem Verpackungssignal ψ . Die PBS dient als Startregion für die Synthese des Minus-Strangs während der Reversen Transkription. Das

Verpackungssignal und die Nachbarelemente vermitteln die Dimerisation der viralen RNA und die Verpackung der viralen RNA in das Vektorpartikel (Kraunus, Schaumann et al. 2004). Der SD und das Verpackungssignal sind zwar keine viralen codierenden Sequenzen, sind aber für die effiziente Verpackung des Vektors essenziell (Hildinger, Abel et al. 1999).

Zur Herstellung infektiöser Partikel, die das Transgen enthalten, müssen Verpackungszellen neben dem Transgen-Vektor auch mit Plasmiden, die die viralen Strukturproteine Gag und Pol und das Hüllprotein env kodieren, transfiziert werden. Man kann den Tropismus der Viren ändern, indem man das ursprüngliche Hüllprotein durch das eines anderen Virus ersetzt (z.B. Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein: VSV-G, Lymphocytic choriomeningitis Virus: LCMV) (Naldini, Blomer et al. 1996). Die so erzeugten viralen Partikel sind jetzt nicht mehr replikationskompetent, da ihnen virale Informationen zur Vermehrung fehlen.

MLV (Murines Leukämievirus)-basierende gammaretrovirale Vektoren können im Gegensatz zu lentiviralen Vektoren nur sich teilende Zellen transduzieren. Die lentiviralen Vektoren können auch ruhende Zellen infizieren (Naldini, Blomer et al. 1996; Palu, Parolin et al. 2000) und haben mit der Größe von 18 kb eine höhere Verpackungskapazität als gammaretrovirale Vektoren. Lentivirale Vektoren haben aber auch Nachteile gegenüber gammaretroviralen Vektoren. So gibt es Probleme bei der Herstellung von stabilen Produktionszelllinien für lentivirale Vektoren, die die Großproduktion der Vektoren für die klinische Nutzung schwierig machen. Vermutlich sind diese Schwierigkeiten auf die Toxizität einiger lentiviraler Proteine zurückzuführen, z.B. Protease (Buchsacher and Wong-Staal 2000). Die beiden Retroviren, MLV und HIV-1, integrieren sich bevorzugt in die besonders aktiv transkribierte Gene, MLV integrieren sich jedoch um die Startregionen der Transkription von Genen und HIV-1 dagegen innerhalb der transkribierten Gene (Schroder, Shinn et al. 2002; Wu, Li et al. 2003).

Ein Problem der retroviralen Vektoren ist ihr onkogenes Potenzial durch die Insertionsmutagenese (Li, Dullmann et al. 2002; Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003; Baum, Kustikova et al. 2006; Modlich, Böhne et al. 2006; Bushman 2007; Daniel and Smith 2008). Bei der Stammzell-basierten Gentherapie mit gammaretroviralen Vektoren wurden von Nebenwirkungen, wie anormaler Expansion von Zellklonen und Leukämie, berichtet (Baum, Dullmann et al. 2003). Für die polyklonalen, reifen T-

Lymphozyten stellte man in einer Mausmodellstudie allerdings eine hohe Transformationsresistenz fest (Newrzela, Cornils et al. 2008).

2.3.2 Der gammaretrovirale Vektor M87o als Fusionsinhibitor in der Gentherapie der HIV-Infektion

Die Arbeitsgruppe von Laer hat zur Gentherapie gegen die HIV-Infektion den gammaretroviralen Vektor M87 entwickelt, der den membranständigen Fusionsinhibitor maC36 exprimiert und dadurch den Eintritt von HIV in die Zielzelle effektiv verhindert (Hildinger, Dittmar et al. 2001; Zahn, Hermann et al. 2008). Das Peptid C36, das die gleiche Sequenz hat wie der Fusionsinhibitor T-20, ist über einen murinen IgG2-Linker mit der Transmembrandomäne vom humanen CD34 verbunden. Der antivirale Vektor M87 wurde dann zur klinischen Anwendung in drei Punkten weiter zu M87o verbessert. Dabei wurde zur Reduzierung der Immunogenität der murine Immunoglobulin (Ig) G2-Linker durch den aus dem humanen IgG2 ersetzt. Durch den Austausch des retroviralen Leaders und durch Optimierung der Codons wurde die Expression erhöht. Zusätzlich wurde die Resistenzbildung erschwert, indem das C-Peptid N-terminal um 10 Aminosäuren verlängert wurde (Egelhofer, Brandenburg et al. 2004).

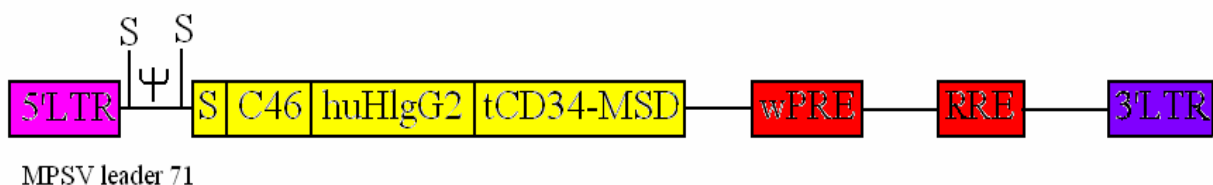


Abbildung 2.5 Der retrovirale Vektor M87o exprimiert einen Fusionsinhibitor. Er besteht aus dem Signalpeptid von LNGFR (Low affinity nerval growth factor receptor) (S), dem inhibitorischen C46-Peptid (C-46), der Gelenkregion des humanen IgG2- (huHlgG2) und der Transmembrandomäne des humanen tCD34 (tCD34-MSD). Zwischen 3'LTR und dem Transgen befindet sich ein post-transcriptional-regulatory-element des Woodchuck-Hepatitis B-Virus (wPRE) und eine RRE-decoy-Sequenz (RRE, Rev-responsive element) (Egelhofer, Brandenburg et al. 2004).

Nach erfolgreichem in vitro-Test des Vektors wurde im Jahr 2004 eine klinische Phase I/II Studie des gammaretroviralen Vektors M87o zur Gentherapie der HIV-Infektion im Hamburger Universitätsklinikum Eppendorf mit wissenschaftlicher Begleitung der Arbeitsgruppe von Laer am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main durchgeführt

(van Lunzen, Glaunsinger et al. 2007). Man wandte die Gentherapie mit M87o bei 10 HIV-Patienten im weit fortgeschrittenen AIDS Stadium an. Dazu wurden die T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Patienten isoliert, ex vivo mit dem Vektor M87o transduziert und anschließend reinfundiert. Die Therapie war gut verträglich und zeigte keine Toxizität. Obwohl das C46-Protein in vitro einen starken Schutz vor der HIV-Infektion aufwies und somit den transduzierten Zellen auch einen klaren selektiven Vorteil verschaffte (Egelhofer, Brandenburg et al. 2004), zeigte die Therapie in vivo zwar einen gewissen Anstieg der CD4-Zellzahl bei einigen Patienten, aber keine Akkumulierung der genetisch modifizierten Zellen und keine Reduzierung der Viruslast, sodass es nicht zu einem dauerhaften therapeutischen Erfolg kam (Lund, Lund et al. 1997; von Laer, Hasselmann et al. 2006; van Lunzen, Glaunsinger et al. 2007).

Mögliche Erklärung dafür könnte der Verlust der Transgenexpression in vivo, der Verlust der Repopulationsfähigkeit der ex vivo modifizierten Zellen oder der geringere selektive Druck in vivo verglichen mit dem in vitro Zellkultur sein. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass C46 immunogen ist und die genmodifizierten T-Zellen durch die zelluläre Immunreaktion eliminiert werden (van Lunzen, Glaunsinger et al. 2007).

2.3.3 SIN Vektoren

Die Integration gammaretroviraler Vektoren kann zur Transaktivierung zellulärer Gene führen, wodurch Leukämie entstehen kann (Beard, Dickerson et al. 2007). Eine mögliche Strategie, um dies zu vermeiden, ist die Herstellung eines selbst-inaktivierenden retroviralen Vektors (SIN Vektoren). SIN Vektoren haben Deletionen der transkriptionalen Enhancer und des Promotors in der U3-Region der 3-LTR. Nach einem Zyklus der Replikation wird die deletierte Sequenz von der 3-LTR in die 5-LTR hineinkopiert, wodurch ein inaktiver Provirus gebildet wird (Coffin, Hughes et al. 1997). Bei diesen SIN Vektoren wird die Transkription des Transgens durch einen internen Promotor, der sich am 3'-Ende des Verpackungssignals und vor dem Transgen befindet, reguliert. Diese Methode wurde angewandt, um die Insertionsmutagenese des konventionellen LTR-getriebenen retroviralen Vektors zu verhindern, indem man die Effekte der Enhancer und Promotoren der viralen LTRs auf die Transkription

benachbarter Gene nach Integration eliminiert (Kraunus, Schaumann et al. 2004; Maruggi, Porcellini et al. 2009).

Nachteile dieser Vektoren bei der Gentherapie ist ein niedrigerer Titer im Vergleich zu den Vektoren, die intakte LTRs haben (mindestens 10-mal niedriger) (Moreno-Carranza, Gentsch et al. 2009). Ungenügende RNA Prozessierung und Promotor Konkurrenz sind die Hauptursache des schlechten Titers (Schambach, Mueller et al. 2006; Schambach, Galla et al. 2007).

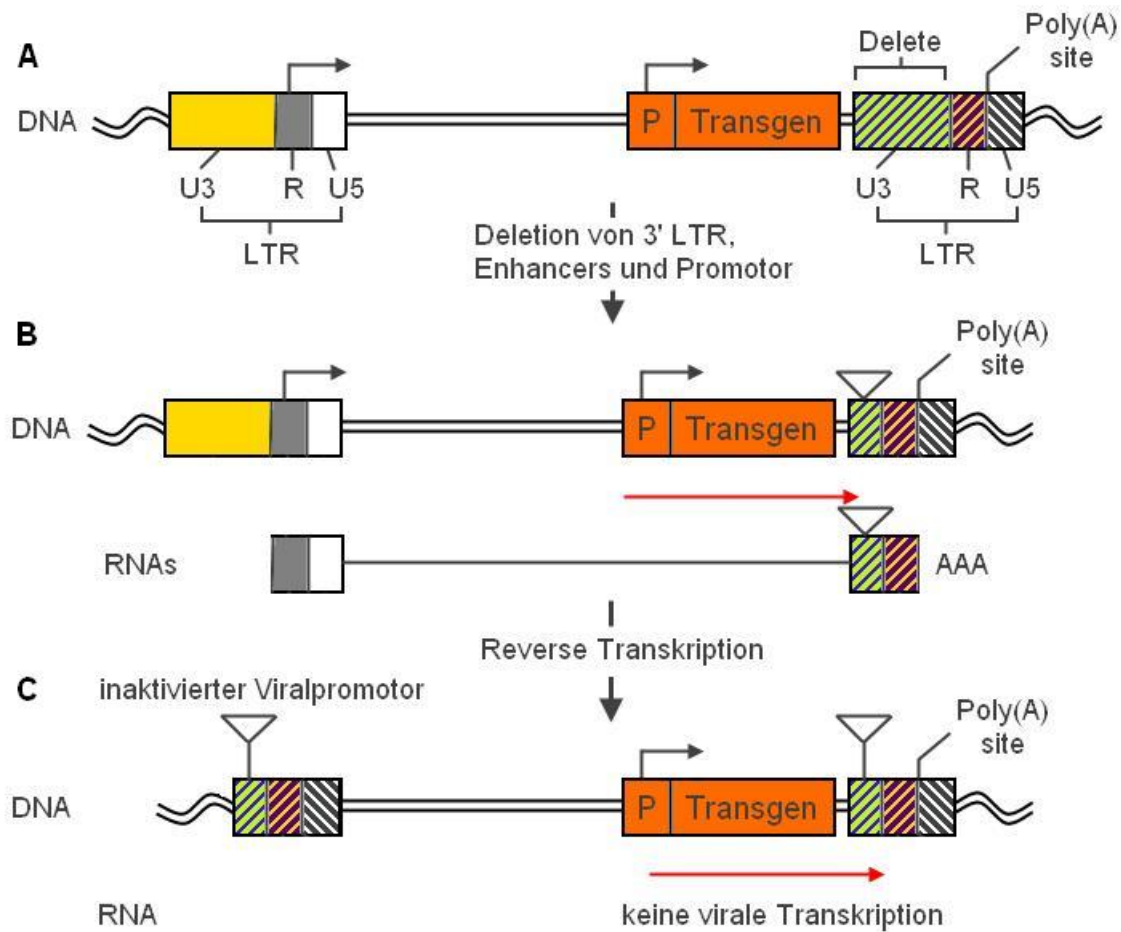


Abbildung 2.6 Aufbau und Replikationszyklus von SIN Vektoren:

Durch die Deletion des Enhancers und des Promotors aus dem 3'LTR eines konventionellen retroviralen Vektors (A) wird ein SIN Vektor (B) gebildet. Nach einer reversen Transkription desselben Vektors findet anschließend eine beidseitige Deletion des LTRs (C) statt. P: Promotor, ∇ : Deletion (Coffin, Hughes et al. 1997).

2.3.3.1 Anwendungen von USE des SV40 und wPRE des Woodchuck-Hepatitis-Virus

In SIN Vektoren ist die Termination der Transkription ineffizient. Dadurch könnte es ohne weitere Modifikationen zur Aktivierung zellulärer Onkogene kommen (Li, Dullmann et al. 2002). Ein weiterer Nachteil von mehreren SIN Vektoren, die sich vom MLV oder von den Lentiviren ableiten, ist eine ungünstige Konfiguration der nicht-translatierten Region (UTR). Dadurch ist die RNA-Prozessierung suboptimal. Die SV-40-USE (upstream sequential element) verbessert die transkriptionale Termination der gammaretroviralen SIN-Vektoren (Schambach, Galla et al. 2007).

Das Posttranskriptionale Regulatory-Element (PRE) wirkt synergistisch mit dem USE zusammen und verbessert die Vektor-Effizienz und Biosicherheit. Dies erfolgt möglicherweise durch die Beeinflussung vom RNA-Export, der Stabilität und Polyadenylation (Sinn, Sauter et al. 2005). Die Stärke des Effekts hängt jedoch von dem Promotor und Zielzelltyp ab (Schambach, Galla et al. 2007).

2.3.3.2 Virale interne Promotoren gegenüber zellulären internen Promotoren

Die Genexpression der SIN Vektoren kann nicht durch die virale LTR-getrieben werden, da diese Deletionen aufweist. Ein interner Promotor ist notwendig. Hierfür können entweder virale (z.B. SFFV) oder zelluläre Promotoren wie EF1 α verwendet werden (Weber and Cannon 2007).

Ein starker Promotor (SFFV) erhöht zwar die Expression des Transgens, aber auch das Risiko der Transaktivierung zellulärer Gene (Flasshove, Bardenheuer et al. 2000). Das Transaktivierungspotenzial eines Promotors ist je nach Zelltyp anders und könnte von der Chromatin-Umgebung und vom transkriptionalen Status der Zielzellen abhängig sein. Daraus kann man folgern, dass ein Promotor, der die Wahrscheinlichkeit der Transaktivierung niedrig hält, aber trotzdem eine ausreichende Transgenexpression ermöglicht, für eine erfolgreiche Gentherapie optimal ist (Weber and Cannon 2007).

Der vom spleen-focus-forming-Virus (SFFV) abgeleitete Promotor hat eine hervorragende Aktivität in Fibroblasten und in hämatopoietischen Zellen (Kraunus, Schaumann et al. 2004). Außerdem ist der SFFV-Promotor über alle Entwicklungsstadien hämatopoietischer Zellen hindurch aktiv (Baum, Hegewisch-

Becker et al. 1995; Yam, Li et al. 2002; Werner, Kraunus et al. 2004; Weber and Cannon 2007).

Eine Alternative ist der Promotor des humanen Elongationsfaktors (EF1-alpha), ein Promotor, der ein hohes Niveau der Transgen-Expression und ein relativ niedriges Risiko der Transaktivierung zellulärer Gene in T-Zellen zeigt (Weber and Cannon 2007). In dieser Studie wurden die beiden Promotoren, SFFV-Promotor und der des Elongationsfaktors EF1-alpha, miteinander verglichen, um den optimalen Promotor in einem SIN-Vektor für die Expression des Transgens mC46 zu finden.

2.3.3.3 Vektorelemente, Insulator HS4 und SAR (MAR)

Sowohl für die Forschung als auch für die klinische Anwendung ist eine stabile Genexpression wichtig. Aber die Expression des integrierten Gens wird von den umgebenden Chromatin durch den sogenannten chromosomalen Positionseffekt beeinflusst (Emery, Yannaki et al. 2002). Silencing der retroviralen Vektoren wird durch Methylierung von CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin) Sequenzen und anschließende Histon Deacetylierung begleitet, welche die Chromatin-Kondensation hervorrufen (Yoder, Soman et al. 1997). So kann der integrierte retrovirale Vektor durch den Prozess des Silencing inaktiviert werden (Pannell and Ellis 2001).

Die regulatorischen Elemente, die den Positionseffekt und das Vektorsilencing vermindern können, werden in zwei Klassen unterteilt. LCR (Locus Control Region) und starke Enhancer gehören zur ersten Gruppe. Sie bilden auch in heterochromatischer Umgebung aktive Chromatin-Strukturen, sodass das Transgen exprimiert wird. Bei Verwendung von LCR treten aber Probleme auf wegen der Gewebsspezifität und wegen des negativen Einflusses auf die Vektorstabilität und den Titer (Emery, Chen et al. 1998; Pannell and Ellis 2001).

Zur zweiten Gruppe gehören das SAR-Element und die chromosomalen Insulatoren. Sie blockieren sowohl positive als auch negative Signale von benachbarten Chromatin. (Recillas 2004). Chromosomale Insulatoren sind DNA-Sequenzen, die die Interaktion der zellulären Enhancer-Promotor-Elemente mit dem Vektor blockieren können. Sie haben aber keinen direkten Einfluss auf die Transkription und unterscheiden sich somit vom klassischen Enhancer und Silencer. Vielmehr helfen sie, die Grenzen zwischen verschiedenen regulierten Genen zu definieren, wenn sie ein Gen

flankieren (Bell and Felsenfeld 1999), oder sie blocken die transkriptionale Aktivation, wenn sie zwischen Enhancer und Promotor platziert sind (Chung, Bell et al. 1997). Es wurde gezeigt, dass Insulatorelemente die Positionseffekte des Transgens reduzieren können, wenn sie auf beiden Seiten des Transgens positioniert werden.

Der Chicken-hypersensitive-Site-4 Insulator (cHS4) ist ein sehr gut untersuchtes Beispiel für die Insulatorlemente der Wirbeltiere. Es wurde in *Drosophila* und vor kurzem auch in mehreren Wirbeltieren beobachtet, dass HS4 die Positionseffekte verhindert (Prioleau, Gendron et al. 2003). Durch die Anwendung dieser Chromatin-Insulatoren kann die unterdrückte Transaktivierung in der Genom-Integrationsstelle bei der Gentherapie effektiv blockiert werden (Recillas-Targa, Valadez-Graham et al. 2004).

SAR-Elemente, auch MAR (Matrix Attachment Region) genannt, sind DNA-Sequenzen, die *in vitro* an die isolierte Kernmatrix binden (Bode, Benham et al. 2000). Sie wurden 1974 zum ersten Mal von Berezney und Coffey beschrieben (Berezney and Coffey 1974). Sie sind DNA-Segmente, die als Anheftungsstellen des Chromatins an die Kernmatrix dienen und bei der Organisation von Chromatin Loops eine wichtige Rolle spielen. Sie sind mehrere hunderte Basenpaare lang, sind reich an AT (70%) und befinden sich upstream und downstream vom Gen. Es wird angenommen, dass SAR-Elemente die Grenze der unabhängigen Chromatin-Domänen definieren, die alle notwendigen cis-agierenden Regelemente besitzen (Agarwal, Austin et al. 1998).

Die SAR-Sequenz bietet keine positionsunabhängige Expression, doch schützt den Vektor vor Erniedrigung der Expressionsrate in ruhenden Zellen. Ferner schützt das SAR-Element das Transgen vor Silencing und erhöht somit die Anzahl der exprimierenden Zellen (Schübeler, Mielke et al. 1996; Auten, Agarwal et al. 1999; Allen, Spiker et al. 2000; Kurre, Morris et al. 2003).

Erhöhungen der Expression der retroviralen Vektoren mit dem SAR-Element wurden in hämatopoietischen Zellen beobachtet (Auten, Agarwal et al. 1999). Retrovirale Vektorkonstrukte mit dem SAR-Element zeigten auch eine langfristig stabile Expression durch Begünstigung der Histon-Hyperacetylierung und Unterbindung der Methylierungsprozesse (Dang, Auten et al. 2000).

2.4 Zielsetzung und Aufgabenstellung der Arbeit

Neben der medikamentösen hochaktiven antiretroviralen Therapie stellt die Gentherapie einen neuen therapeutischen Ansatz gegen die HIV-Infektion dar. Mehrere antivirale Gene gegen die HIV-Infektion wurden beschrieben. Insbesondere die genetische Modifikation von T-Lymphozyten zur sogenannten intrazellulären Immunisierung der Zielzellen ist eine effektive gentherapeutische Strategie (von Laer and Brandenburg 2001). Das hier verwendete antivirale Gen codiert den membrangebundenen Fusionsinhibitor maC46, der eine hohe inhibitorische Wirkung gegen sowohl Zellkultur-adaptierte als auch primäre HIV-Isolate zeigt und zu einem selektiven Überlebensvorteil der transduzierten gegenüber nicht-transduzierten Zellen führt. Die klinische Studie im Jahre 2004 mit dem Vektor M87o, der das maC46 kodiert, zeigte eine gute Verträglichkeit und keine Toxizität der Therapie. Aber es konnte kein antiviraler Effekt des Transgens beobachtet werden, was vermutlich auf die geringe Anzahl der genmodifizierten Zellen in vivo zurückzuführen war. Diese geringe Menge könnte durch eine ineffiziente Genexpression oder den Verlust dieser durch Silencing verursacht worden sein.

Für den klinischen Therapieerfolg muss das Vektorsystem vor allem sicher sein und das Transgen stabil und langanhaltend in den Zielzellen exprimiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Test verschiedener gammaretroviraler Vektoren in SIN-Konfigurationen, die das Risiko der Insertionsmutagenese vermindern sollen und somit ein sicheres Vektorsystem für die klinische Anwendung des Transgens maC46 darstellen (Baum, Dullmann et al. 2003). Um stärkere und längeranhaltende Genexpressionen zu ermöglichen, wurden zusätzliche regulatorische Elemente, wie wPRE, Insulator und SAR-Element, in die SIN-Vektoren integriert. Ebenso wurde die Effektivität der internen Promotoren, des viralen SFFV Promotors und des zellulären EF1 α Promotors, miteinander verglichen, jeweils mit oder ohne Insulatorelement cHS4. Da die antivirale Effektivität von maC46 stark mit der Expressionsstärke des C-Peptids auf der Zelloberfläche korreliert (Hermann, Martinius et al. 2009), sollte auch untersucht werden, ob maC46 auch in der SIN-Konfiguration für eine klinische Therapie ausreichend exprimiert werden kann.

Insgesamt wurden 5 SIN-Vektoren in Titer, Expressionsstärke und Langzeit-Genexpression untereinander und mit dem klassischen gammaretroviralen Vektor

M87o verglichen. Dazu wurden zunächst eine humane T-Zelllinie (PM-1) und danach primäre humane T-Zellen als Testzellen verwendet. Die Versuche wurden dann mit murinen T-Zellen wiederholt, wobei primäre murine T-Zellen in immundefiziente Mäuse transplantiert wurden, um die Genexpression in vivo weiter zu verfolgen.

3 Material

3.1 Laborchemikalien

Substanz	Hersteller
37% Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Aceton	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Butanol	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (rein)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merk, Hohenbrunn
HCl	Merck, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
NP40	Sigma, Deisenhofen
Retronectin	TaKaRa Biomedicals, Apen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
tris(Hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Tween-20	Merck, Hohenbrunn
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zelllysepuffer (5x)	Promega, Mannheim

3.2 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Kulturmedium/Lösung	Bestandteile
Ampilicilin-Lösung	100mg/ml in ddH ₂ O sterilfiltriert
CaCl ₂ -Lösung	2,5M CaCl ₂ in ddH ₂ O sterilfiltriert
DNA-Probenauftragspuffer (6x)	50% (v/v) Glyzerin 0,2% (v/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 10mM EDTA
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) in ddH ₂ O gelöst
FACS-Puffer	2% FCS in PBS

Fixierungslösung	2% Formaldehyd (v/v) PBS
HEPES-Puffer (2x)	100mM HEPES 281mM NaCl 1,5mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,1 sterilfiltriert und aliquotiert Lagerung bei –20°C, kurzzeitige Lagerung (bis zu mehreren Wochen) bei 4°C
Kristallviolettstammlösung	2mg/ml Kristallviolett ddH ₂ O
Kryo-Konservierungsmedium	10% DMSO FCS
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton 5g/l Hefeextrakt 10g/l NaCl mit 2M NaOH auf pH 7,4 einstellen autoklavieren (121°C, 20min)
NP40-Lösung	5% (w/v) in ddH ₂ O
Penizillin/Streptomycin	10.000Units Penizillin, 10mg Streptomycin in 100ml 0,9% NaCl
Retronectin-Lösung	In 1ml H ₂ O aufgenommen, dann mit PBS auf 50µg/ml eingestellt und sterilfiltriert
Saccharose-Lösung	20% Saccharose in PBS sterilfiltriert
TAE-Puffer (50x)	Tris 1.220g, Essigsäure 285.5g, EDTA (0,5 M) 500ml, H ₂ O ad 5l auf pH 8,0 einstellen
TE-Puffer	Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM in dd H ₂ O auf pH 8,0 einstellen

Trypsin/EDTA (10x)	5g Trypsin, 2g EDTA in 100ml 0,9% NaCl
--------------------	--

Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und sterilisiert (20min, 121°C, 2bar). Falls die Lösung hitzeempfindlich war, wurde sie steril filtriert oder bereits steril bezogen.

3.3 Antikörper

Antikörper	Herkunft und ihre Spezifität	Hersteller
α gp41 C2F5	Humaner monoklonaler Antikörper, der an das Epitop ELDKWA in der C- terminalen heptad repeat“ 2 von HIV-1 gp41 erkennt. (Buchsacher, Freed et al. 1995)	Polymun, Wien
PE gekoppelte 2F5	Antikörper wurde von Berckman Coulter mit PE markiert.	Polymun, Wien
Ziege- α HIG-PE	Antikörper aus Ziegen, der spezifisch den Fc-Teil humaner IgG- Antikörper erkennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE = FL-2 im FACS) gekoppelt ist.	Dianova, Hamburg
Hamster- α CD3	Antikörper aus dem Hamster, der murines CD3 bindet.	BD, Heidelberg
Hamster- α CD3-	Antikörper aus dem Hamster, der murines CD3 bindet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin5 (Cy5 = FL-4 im FACS) gekoppelt ist.	Caltag-Laboratories, Hamburg
Hamster- α CD4-PE-Cy5.5	Antikörper aus dem Hamster, der murines CD4 bindet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin- Cyanin5.5 (PE- Cy5.5 = FL-3 im FACS) gekoppelt ist.	Caltag-Laboratories, Hamburg
Hamster- α CD8-PE	Antikörper aus dem Hamster, der murines CD8 bindet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE = FL-2 im FACS) gekoppelt ist.	Caltag-Laboratories, Hamburg

3.4 Material für Zellkulturarbeiten

3.4.1 Medien und Zusätze

Substanz	Hersteller
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Casyton, Puffer für Zellzahlbestimmung	Schärfe System, Reutlingen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glucose 4,5g/l, ohne L-Glutamin	BioWhittaker Cambrex, Verviers Sprl, Belgien
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS) ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}	PAA, Paschingen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
G418	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200mM	PAA, Paschingen
Penicillin / Streptomycin	PAA, Paschingen
RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin	BioWhittaker Cambrex, Verviers Sprl, Belgien

Zur Kultivierung von Zellen wurden standardisierte Medien verwendet. Diese Medien wurden hergestellt, indem man die Nährlösungen (DMEM oder RPMI1640) mit 5% FCS, 2% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin komplementiert hat.

3.4.2 Zellen und Anzuchtmedien

Zellen	Beschreibung	Referenz
293T	Embryonale Nierenzelllinie; Abgeleitet von der Zelllinie HEK293; enthält das SV40 große T-Antigen, DMEM mit 5 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin	Pear, W. S., et al 1993

PM-1	T-Lymphoblast; Klon der Zelllinie HUT78, RPMI1640 mit 5% FCS, 2% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin	Lusso P., 1995
SC1	Murine Fibroblastenzelllinie, DMEM mit 5 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin	Hartley, J. W., 1975
primäre humane T-Zell (PBL)	PBL wurde von Blutcoat isoliert und CD8 T-Zellen deletiert, X-vivo Standard mit 5% Humanserum, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin	
Primäre, murine Lymphozyten	Isoliert aus Milz und Lymphknoten von C57 BL/6Spendermäusen, Maus – Medium – Spezial RPMI 1640 10 % FCS 2 % Glutamin 1 % Penicillin / Streptomycin, Natrium Pyruvat (1x) NEAA (1x) β – Mercaptoethanol (1x)	

3.5 Material für molekularbiologische Arbeiten

3.5.1 Bakterien

Stamm	Beschreibung	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> , TOP10	F- F' (lacIq Tn10(TetR) mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Heidelberg

3.5.2 Plasmide

Laufende Nummer	Name	Beschreibung	Referenz/ Hersteller
M130	GALV Env	Helferplasmid zur Expression des Hüllproteins vom Gibbon ape leukaemia virus für Pseudotypisierung retroviraler	Stitz et al., 2000

		Partikel	
M579	SV 40- gag-pol	MLV Gagpol Expressionsplasmid mit SV40 Promotor	AG von Laer
M187	EF1 α -eco-env	Retroviraler Vektor, der das ecotrophe Hüllprotein von MLV codiert	Stitz et al., 2000

3.5.3 Retrovirale Vektoren und SIN Vektoren

Laufende Nummer	Vektorname	Interner Promotor	Marker-gen	3' UTR
M218	M87o-RRE			wPRE / RRE
M341	MP71-GFP		GFP	
M809	EF-C46	EF1-alpha		
M810	EF-C46-In	EF1-alpha		cHS4
M811	SF- C46	SFFV		
M812	SF-C46-In	SFFV		cHS4
M814	EF-C46-Sa	EF1-alpha		SAR

Plasmidkarten sind im Anhang zu finden.

3.5.4 Enzyme und DNA Größenstandards

Enzyme	Hersteller
100bp-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main
1Kb-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Desoxynucleotid-Mischung (dNTP; 10mM je Nucleotid)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNAse I	Invitrogen, Karlsruhe
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

3.5.5 Durchflusszytometrie- Beads

Standardbeads	Hersteller
Quantum Simply cellular Anti-human IgG	Bangs Laboratories, Fishers (IN, USA)
Quantum Simply cellular Anti-mouse IgG	Sigma, Deisenhofen

3.6 Geräte und Labormaterial

3.6.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer, SubCell GT	BioRad, München
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus, Hanau
Casy TT, Zellzählsystem	Schärfe System, Reutlingen
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD, Heidelberg
Elektrophorese-Apparatur für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
Heizblock DriBlock DB-2D	Techne, Wertheim
Inkubator Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau

Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, Krefeld
Lumistar Optima	BMG LABTECH GmbH, Offenburg
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode
Microscope DM IL	Leica, Wetzlar
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton (USA)
Schüttler Duomax 2030	Heidolph, Kelkheim
Spannungsquelle Power-Pac 1000	BioRad, München
Sterilbank Hera Safe HS12	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L8-80M	Beckman, Krefeld
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman, Krefeld
Ultrazentrifugenrotor SW32-Ti	Beckman, Krefeld
UV-Dokumentationssystem; Gel Doc 2000	BioRad, München
Vortexer, Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich (Schweiz)
Waage 440-41	Kern & Sohn GMBH, Balingen
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großwedel
Wippschüttler	Bühler GmbH, Hechingen

3.6.2 Labormaterial

Material	Hersteller
15ml Röhrchen	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
20ml Einmalspritze	Codan, Lensahn
24-Lochschale Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen
250ml Vakuumfiltereinheit (0,45µm Porengröße)	Corning, New York (USA)

50ml Röhrchen	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
96-Wellschalen	Corning, New York (USA)
Filterspitzen Biosphere 10µl	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 20µl	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 200µl	Sarstedt, Nümbrecht
Fixierer (für Hyperfilm)	Kodak, Rochester (USA)
Kryoröhrchen (2ml)	Nalge Europe Neerijse, Belgium
Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (10cm Ø) Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen
Rundbodenröhrchen, 5 ml (Polystyrol, FACS-Röhrchen)	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenaufsatzfilter Millex-HA 0,45µm	Millipore, Schwalbach
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 10ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 25ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 2ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 5ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

3.7 Kits

Kit	Hersteller
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (DNA-Präparation, analytisch)	Genomed, Löhne
JETquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Löhne

(Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen)	
Nucleobond AX Maxiprep Kit (DNA-Präparation)	Machery & Nagel, Düren
Qiamp viral RNA Mini Kit (virale RNA-Isolierung)	Qiagen, Hilden

3.8 Materialien für Tierexperimente

3.8.1 Mäusstämme und Haltungsbedingungen

Die verwendeten Mäusstämme stammten von Charles River Laboratories. Die Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) gehalten. Alle Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (VI 63 – 19 c 20/15-F 123/21 und VI 63 – 19 c 20/15-F 123/22).

- C57BL/6 Ly5.1 (mit dem Antigen CD 45.1) (Janowska-Wieczorek, Majka et al. 2001)
- B6.129S7-Rag^{tm1Mom}/J (Mombaerts, Iacomini et al. 1992)

Rag-1 defiziente Mäuse exprimieren keine reifen T- und B-Lymphozyten und dienen als Empfängertiere.

3.8.2 Tierexperimentelle Materialien

Materialien	Verwendungszweck	Hersteller
Ohrlocher (Napox)	Markierung der Versuchstiere	Heiland, Hamburg
Microvette (EDTA-beschichtet)	Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht
Präparationsbesteck (Hebu)	Sektion	Heiland, Hamburg

Insulinspritze	Intravenöse Transplantation	BD, Heidelberg
Metallsieb	Homogenisieren von Organen	Sigma, Deisenhofen
Zellsieb (100µm)	Homogenisieren von Organen und Filtern von Zellsuspensionen	BD, Heidelberg

4 Methoden

4.1 Transformation der Escherichia coli

4.1.1 Kultivierung und Herstellung chemisch kompetenter E. coli

Plasmidtragende E. coli-Stämme wurden in mit 100µg/ml Ampicillin versetztes LB-Selektivmedium kultiviert. Bakterien wurden auf einer Petrischale mit LB-Agar-Medium ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C ca. 15 Stunden lang inkubiert. Die einzelnen Bakterienklone wurden in 4ml LB-Medium überführt und bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Ein Viertel dieser Lösung wurden in 400ml LB-Medium gemischt und ca. 3 bis 4 Stunden lang auf einem Schüttler weiter, bis die optische Dichte des Mediums bei 600nm zwischen 0,4 und 0,6 lag, inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zum Stoppen des Wachstums der Bakterien auf Eis gekühlt.

Im nächsten Schritt wurden die Bakterien durch Zentrifugieren sedimentiert (10.000g; 10min). Anschließend wurden sie in 100ml eiskaltem 50mM CaCl₂ resuspendiert und auf Eis inkubiert (15min). Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben erneut sedimentiert und in 20ml 50mM CaCl₂ / 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Nach einer Inkubation (4h) bei 4°C wurden die Bakterien à 200µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.1.2 Transformation chemisch kompetenter E. coli

50µl chemisch kompetente Bakterien wurden für die Transformation verwendet. Dabei wurden sie zuerst auf Eis aufgetaut und dann mit 10-50µl DNA eines Ligationsansatzes oder mit 10ng *supercoiled* Plasmid-DNA versetzt. Nach der 20-minütigen Inkubationszeit erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 120s. Nach einer Abkühlung von 5 Minuten auf Eis wurden sie in 500 µl LB-Medium aufgenommen und für 45min bei 37°C unter Schütteln bei 125 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 8000 U/min herunterzentrifugiert und 450µl Überstand verworfen. Die im Restvolumen enthaltene Zellen wurden nach dem Resuspendieren auf

antibiotikumhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Nach dieser Zeit wurden mehrere Einzelkolonien für die weitere Analyse ausgewählt und in 2ml einer Flüssigkultur angeimpft, die für eine Plasmid-Minipräparation geeignet war.

4.1.3 Lagerung von E. coli

Um die Bakterien dauerhaft lagern zu können, wurden transformierte Bakterien in DMSO-haltigen Kulturen angelegt. Hierfür wurden die Zellen im antibiotikumhaltigen LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Kulturvolumen wurde mit derselben Menge von 7%-iger DMSO/PBS-Lösung gemischt und bei -80°C gelagert.

Bei 4°C war die Lagerung von Bakterienkolonien auf Agarplatten oder von Flüssigkulturen ohne Verlust von Teilungsfähigkeit der Bakterien über mehrere Wochen möglich.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung der Plasmid-DNA aus E. coli

Die Isolierung vom Plasmid erfolgte zum analytischen Maßstab mithilfe des JET quick plasmid spin Kit, zum präparativen Maßstab mit Hilfe des Nucleobond AX Maxiprep Kits nach der Anleitung des Herstellers.

4.2.2 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Zur Herstellung von spezifischen DNA-Fragmenten für weitere Versuche der isolierten DNA-Plasmide wurden die DNA-Restriktionsendonucleasen verwendet. Dabei schneiden Restriktionsenzyme die DNA nur an bestimmten enzyspezifischen Sequenzen. Durch Restriktionen kann auch ein DNA-Insert innerhalb eines Plasmids analysiert werden, indem man die entstehenden Fragmente untersucht. Dafür wurden etwa 0,5 µg Plasmid-DNA zur Restriktion gegeben. Die präparative Menge der DNA

war ca. 5-6µg. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl für eine Analyse und von 70 µl für eine Präparation, wobei jeweils 5 Units und 10 Units von Restriktionsenzymen benötigt wurden. Die Differenz zum Endvolumen wurde mit ddH₂O aufgefüllt. Die Wahl des Puffers und der Inkubationstemperatur erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die Inkubationszeit der Proben betrug von 30min bis zu 4h.

4.2.3 Gelelektrophorese von DNA

Die durch den Restriktionsvorgang entstandenen Fragmente wurden zur Überprüfung und Präparation auf 0,8-2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung der Gel wurde die Agarose in TAE-Puffer gelöst und in einem Mikrowellenofen erhitzt. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in eine Flachbettform gegossen. Die DNA wurde durch Zugabe zweier unterschiedlicher Chemikalien gefärbt, zum einen durch Ethidiumbromid (2µl EthBr-Stammlösung pro 50ml Gel) und zum anderen durch Kristallviolett (50µl Stammlösung pro 50ml Gel). Beide Chemikalien interkalieren in die DNA, wobei der Kristallviolett-DNA-Komplex bei normalem Weißlicht sichtbar ist und der Ethidiumbromid-DNA-Komplex nur bei UV-Bestrahlung aufleuchtet.

4.3 Methoden der Zellkultur

4.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die Sterilbank wurde vor Arbeitsbeginn mit 70% Ethanol gereinigt. Alle Zelllinien wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle Materialien (Plastikmaterial, Medien, Zusätze etc.) für Zellkulturarbeiten wurden vorher auf eine geeignete Weise sterilisiert oder direkt steril bezogen.

4.3.2 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 90-95%-igen Luftfeuchtigkeit sowie bei 5%-igen CO₂-Gehalt aufbewahrt. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert oder die Zellen wurden bei 70-80%-iger Bedeckung der Kulturflasche passagiert.

Dabei wurde der Zellrasen nach der Entfernung des verbrauchten Mediums mit sterilen PBS gewaschen. Danach wurde eine möglichst kleine Menge Trypsin-EDTA-Mix (von der Flächengröße des Flaschenbodens abhängig) dazugegeben, um die Adhäsionsmoleküle der Zellen vom Boden der Flasche zu trennen. Nach einer kurzen Inkubation wird durch leichtes Klopfen an die Flasche die Zellen komplett von dieser gelöst. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren auch voneinander getrennt. Danach wurden die Zellen im frischen Medium verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt.

4.3.3 Isolierung von PBMC aus Blut und anschließende Stimulierung

Das Buffy-Coat-Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt. 25ml Ficoll wurden vorsichtig mit 25ml Blut überschichtet und anschließend 30min lang mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert (1.500 rpm, RT). Danach wurde die hellweiße Interphase, welche die PBMC enthielt, vorsichtig abgesaugt und die Interphasezellen wurden sodann zweimal in PBS gewaschen. Darauf wurde der Überstand verworfen und die Zellsedimente aus zwei Reaktionsgefäßen vereinigt und in 50ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe vom Zellgerät Casy TT der Firma Schärfe Systeme gezählt und 10min bei 1200 UpM zentrifugiert, dann in MACS-Puffer resuspendiert.

Um die zytotoxischen T-Lymphozyten zu deletieren, wurden anti CD8 Mikrobeads zu der Zellsuspension hinzugefügt und 30min bis 1 Stunde lang bei 4°C inkubiert. Die CD8 Zellen wurden in einem magnetischen Feld von den übrigen im Reaktionsansatz vorhandenen Zellen depletiert. Die CD-8-Deletion wurde nach der Färbung der Proben mit Antikörper gegen CD8 und gegen CD4 durch FACS Analyse überprüft. Die CD8-depletierten primär-humanen Blut-Monozyten wurden in sechs Wellplatten mit ex vivo Medium, dem 5% humanes Serum, 2% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, und 100 U/ml IL 2 zugefügt waren, zur Expansion der Zellen ausgesät. Zusätzlich wurde in jede Wellplatte entweder $1,5 \times 10^7$ Xellerate Beads pro ml der Zellsuspension oder 30ng

OKT zur Wachstumsstimulierung hinzugegeben. Die Platten wurden bei 37°C für vier Tage kultiviert.

4.3.4 Isolierung von murinen Lymphozyten und anschließende Stimulierung

Murine Lymphozyten wurden aus Wildtyp-Mäusen (C57BL/6 Stamm CD45.1 oder CD45.2) isoliert. Dazu wurden den Mäusen die Milz, die inguinalen (Leisten-) und 3-5 mesenterialen Lymphknoten entnommen und in ein 50ml Reaktionsgefäß, das 20ml eiskaltes PBS mit 1% P/S enthielt, überführt. Die Organe wurden mit Hilfe des sterilen Stempels einer Spritze durch ein Sieb gedrückt. Das Homogenisat wurde durch ein Zellsieb in ein neues 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Das Sieb wurde zweimal mit je 10ml PBS mit 1% P/S gewaschen und die Waschlösungen wurden ebenfalls durch das Zellsieb in das 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Die Zellen wurden 10 Minuten lang bei 1400UpM und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50ml Reaktionsgefäß dekantiert und erneut 10 Minuten lang unter gleichen Umständen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die beiden Sedimente wurden in jeweils 10ml PBS mit 1% P/S resuspendiert und vereinigt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit 10ml Histopaque unterlegt, wobei eine 10ml Spritze mit einer langen Kanüle verwendet wurde.

Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 2000 UpM und bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Es wurden vorsichtig 8-10ml aus der Interphase mit einer 1000µl Gilson-Pipette entnommen und in ein neues 50ml Reaktionsgefäß, das 10ml PBS mit 1% P/S enthielt, überführt. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 1400 UpM und bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 10ml PBS mit 1% P/S resuspendiert, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 10ml PBS mit 1% P/S resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

Die Prästimulierung von primären murinen Lymphozyten erfolgte mit Hilfe von magnetischen Beads (M-450 Epoxy Beads). Die magnetischen Partikel wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in 1ml PBS aufgenommen und mit 60µl αCD3- und αCD28-Antikörper in einem Reaktionsansatz gemischt. (Für 4×10^8 Beads, bei einer Antikörperkonzentration von 1mg/ml, also 60µl). Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 24 Stunden bei 37°C auf dem Rotator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Beads aus dem Rotator genommen und der Überstand durch magnetische Kraft entfernt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1ml 0,1%-igem MSA/PBS gemischt und für 5 Minuten auf dem Rotator bei Raumtemperatur gewaschen und geblockt. Nach der Wiederholung der Wasch- und Block-Schritte wurden die Beads in 1ml 0,1%-igem MSA/PBS aufgenommen und 16-24 Stunden bei 4°C auf dem Rotator inkubiert.

Am Tag danach wurden die Beads wieder durch magnetische Kraft vom Überstand aufgehoben und mit 1ml 0,1%-igem MSA/PBS im Reaktionsansatz gemischt. Zur weiteren Anwendung wurden die Beads bei 4°C gelagert.

Für die Stimulierung wurden die mit α CD3- und α CD28-Antikörper beschichteten magnetischen Partikel (Beads) im Verhältnis von 3:1 zu den Zellen eingesetzt. Die Stimulierung wurde in 6-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte wurden 7,215ml Maus-Medium-Spezial, $4,9 \times 10^6$ frisch isolierte murine MNCs und $1,46 \times 10^7$ α CD3- und α CD28-Beads gemischt. Die benötigte Menge an α CD3- und α CD28-Beads wurde vorher in ein neues Reaktionsgefäß überführt, einmal mit PBS gewaschen, ins Medium aufgenommen und dann zu den Zellen gegeben.

Am nächsten Tag wurde hIL-2 (100U/ml Endkonzentration) zugegeben (72 μ l pro Vertiefung der 6-Loch-Mikrotiterplatte).

Am vierten Tag wurden die Beads von den Zellen entfernt. Dazu wurde der Ansatz stark resuspendiert, in 15ml Reaktionsgefäße überführt und in den Magneten gestellt. Der Überstand, der die Zellen enthielt, wurde abgenommen. Die Zellen wurden gezählt und für die Transduktion eingesetzt.

4.3.5 Transiente Transfektion zur Herstellung gammaretroviraler Vektoren

Die Produktion des gammaretroviralen Vektorpartikels erfolgte durch eine transiente Transfektion der humanen Nierenepithelzelllinie 293T mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Bei dieser Methode wird die DNA zusammen mit Calcium-Phosphat-Kristallen komplexiert und in die Zellen endozytotisch aufgenommen. Replikationsinkompetente virale Vektoren wurden mithilfe des sogenannten Drei-Plasmid-Systems hergestellt. Hierbei ist die genetische Information des Virus auf ein lenti- oder gammaretroviralen Transfervektorplasmid und zwei entsprechende

Hilfsplasmide verteilt. Wegen der räumlichen Separation wird die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von replikationskompetenten Retroviren durch homologe Rekombination zwischen den drei Plasmiden stark vermindert. Das Transfervektorplasmid enthält das Transgen, das virale Verpackungssignal (ψ) und LTRs, jedoch keine genetische Information zur Generierung viraler Proteine. Die beiden Hilfsplasmide vervollständigen die fehlenden viralen Genfunktionen *in trans*. Sie liefern die Information für Strukturproteine und virale Enzymfunktionen (Hilfsplasmid GagPol), sowie das Gen für das Hüllprotein (Hilfsplasmid Env). Die so produzierten viralen Vektorpartikeln tragen als einzige genetische Information den Transfervektor, da nur dieser Vektor in die Partikel aufgenommen werden kann. Die so gewonnenen Vektoren sind daher auf einen einzigen Infektionszyklus beschränkt.

Zur Herstellung der Vektoren wurden 24h vor der Transfektion 6×10^6 293T Zellen in einer 10cm-Schale in einem Volumen von 8ml Standard-DMEM ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gegen frisches Transfektionsmedium ausgetauscht. Für gammaretrovirale Verpackungen wurde das Standard-DMEM mit Chloroquin (25 μ M Endkonzentration) verwendet, welches nur mit 2% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und Chloroquin (25 μ M Endkonzentration) supplementiert war. Der DNA-Transfektionsansatz für je eine 10cm-Schale wurde folgendermaßen in einem 1,5ml Röhrchen vorbereitet:

Zusammensetzung des Transfektionsansatzes:

gammaretrovirale Vektoren		DNA-Menge [μl]
Gagpol-Expressionsplasmid [1 μ g/ μ l]	M579	12,5
Transfervektorplasmid [1 μ g/ μ l]	C-Peptid- Vektoren	7,5
Env-Expressionsplasmid [1 μ g/ μ l]	GALV-Env	1
H ₂ O		ad 450
CaCl ₂ [2,5M]		50

Die DNA-Mischung wurde anschließend langsam zu 500 μ l 2x HEPES-Puffer unter ständigem Vortexen tropfenweise zugesetzt und bei RT inkubiert (20min). In dieser Zeit bildeten sich die DNA-haltigen Calciumphosphatpräzipitate. Die Komplexe wurden dann auf die Zellen gegeben. Nach 5-6h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Standard-DMEM ersetzt. Vektorhaltiger Überstand wurde 24h und

48h nach Transfektion gesammelt und durch einen 0,45µm Filter filtriert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde entweder direkt aliquotiert und bei –80°C für spätere Anwendung gelagert oder zuvor durch Ultrazentrifugation konzentriert.

4.3.6 Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Vektoren und Titration

Zur gammaretroviralen Transduktion mit den Überständen mit Galv Env (M130) wurden $1-2 \times 10^5$ humane PM-1 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Bei den Überständen mit ecotrophen-Env (M187) wurden dagegen 5×10^4 murine SC-1 Zellen für pro Vertiefung in eine 24-Lochschale ausgesät (500µl Gesamtvolumen mit Standard-RPMI1640-Medium oder 1ml von Standard-DMEM). Anschließend wurden die vektorhaltigen Überstände in unterschiedlichen Mengen auf die Zellen gegeben. Es erfolgte dann ein einstündiger Zentrifugationsschritt bei 31°C und 650g für gammaretrovirale Transduktion, um eine bessere Aufnahme der Vektorpartikel in die Zellen zu gewährleisten. Nach 4 Tagen wurde bei PM-1 Zellen die Zellsuspension nach sorgfältigem Resuspendieren in FACS Röhrchen überführt. Bei SC-1 Zellen wurde das Medium entfernt, und nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin von der Unterlage abgelöst. Danach wurden die SC-1 Zellen in 1ml DMEM Standardmedium resuspendiert und in FACS Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden mit FACS Puffer gewaschen und mit Antikörper (bei GFP-haltige Zellen ohne Färbung, nur Fixierung) gefärbt, um die FACS Analyse durchzuführen. Die Analyse erfolgte in Bezug auf ihre Fluoreszenz durchflusszytometrisch (bei GFP-Markergen oder maC46-Gen). Mit der folgenden Formel konnte aus dem Anteil der transduzierten Zellen (im FACS fluoreszierend) der Titer des Überstands berechnet werden:

Titer [infektiöse Einheiten/ ml] = (transduzierte Zellen [%]/100) x ausgesäte Zellen x Verdünnungsfaktor

4.3.7 Transduktion auf mit Retronektin beschichteten Platten

Für die Transduktion von T-Lymphozyten mit Retronektin wurden unbeschichtete (*non-tissue-culture*) Zellkulturplatten verwendet, entweder 24- oder 6-Loch-Mikrotiterplatten. Pro Vertiefung wurden 400 bzw. 1000µl Retronektin (Konzentration 50µg/ml) eingesetzt und die Platten wurden 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Retronektin wurde nach der Verwendung im Kühlschrank gelagert und konnte bis zu viermal benutzt werden. Nach dem Entfernen des Retronektins wurden die Platten mit 2% BSA in PBS (400 bzw. 1000µl) für 30min bei RT geblockt, einmal mit HBSS und einmal mit PBS gewaschen.

In jede Vertiefung wurden dann 1 bzw. 3ml retroviraler Überstand (Kapitel 3.2.8.1) gegeben und die Platten wurden 30min bei 2400rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann entfernt und es wurde zwei weitere Male Überstand zugegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand zum dritten Mal verworfen und in eine Vertiefung einer 24-Loch-Mikrotiterplatte bzw. in eine Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte $3-4 \times 10^6$ stimulierter T-Zellen in 3ml Maus-Medium-Spezial mit hIL-2 (100 U/ml) gegeben. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Der Vorgang wurde am nächsten Tag mit einer neu beschichteten Platte wiederholt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit zusätzlichem Medium versorgt. Die Transplantation der transduzierten T-Zellen erfolgte dann einen Tag später. Vor der Transplantation wurde eine FACS-Analyse hinsichtlich der Transduktionseffizienz und noch eine Färbung für CD4 und CD8 positive T-Zellen durchgeführt.

4.3.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) ermöglicht die simultane Analyse verschiedener optischer Eigenschaften von Zellen. Die vereinzelt Zellen wandern hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messküvette. In der Küvette passieren die Zellen einen Laserstrahl, wobei die Absorption und Streuung des Lichts durch die Zellen bestimmt werden. Diese beiden Parameter spiegeln die Größe bzw. die Granularität der Zelle wider und werden bei der Messung jeder Zelle als relative Größen zugewiesen.

Durch Immunfärbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper oder durch Expression fluoreszierender Proteine (z.B. GFP) können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der Fluorophormoleküle.

4.4 Tierexperimentelle Methoden

4.4.1 Tierhaltungsbedingungen

Die Mäuse wurden gemäß der Richtlinien der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) gehalten und in der Tierhaltungsanlage des Georg-Speyer-Hauses weiter gezüchtet. Die Tiere wurden ausschließlich in Filterdeckel-Käfigen gehalten. Für die immundefizienten Tiere wurden individuell ventilierte Käfige (*individually ventilated cage*, IVC) verwendet. Zur Keimabschirmung für die Versuchstiere wurde der Raum mit Überdruck belüftet. Zusätzlich wurde der Raum nur mit Schutzkleidung, OP-Gesichtsmaske, Handschuhen und Überschuhen betreten. Die Raumtemperatur wurde bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% bis 60% auf 22°C konstant gehalten. Der Lichtrhythmus erfolgte in einem wechselnden Hell-Dunkel-Intervall von 12 Stunden. Die Lichtmenge betrug 300 Lux. Gemäß dem Standard der Firma bekamen die Tiere ssniff(Soest) und Leitungswasser zur Versorgung, wobei der allgemeine Gesundheitszustand täglich durch den Experimentator, das Tierpflegepersonal, sowie durch veterinärmedizinische Kontrollen überwacht wurde.

4.4.2 Transplantation von Mäusen mit hämatopoietischen Zellen

Die transduzierten murinen T-Lymphozyten, die aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6 Stamm CD45.1) isoliert und stimuliert worden sind, wurden in die immundefizienten Mäuse (B6.129S7-Rag^{tm1Mom}/J) transplantiert. Es wurden 2×10^7 Zellen intraperitoneal injiziert. Murine T-Zellen wurden am vierten, fünften und sechsten Tag nach Isolierung transduziert und am siebten Tag transplantiert.

4.4.3 Blutentnahme und Färbung für FACS

Bei Blutentnahme von den Mäusen ist das Volumen bis zu 10% des gesamten Blutvolumens in der Regel ohne erkennbare Nebenwirkungen verträglich. Bei Entzug von mehr als 15% des Blutvolumens kann starke Schädigungen hervorgerufen werden. Blutentnahme erfolgt entweder aus der Schwanzvene oder durch Herzpunktion bei der Endanalyse mit der Tötung.

Bei der Entnahme aus der Schwanzvene wird, nachdem die Tiere in einer Mausfalle fixiert worden sind, der Schwanz mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Danach wird mit einem Skalpell der Schwanzvene eine Schnittwunde versetzt und daraus das Blut mit EDTA beschichteten Kapillaren (Microvetten) gewonnen. So wurde 50-100µl Blut entnommen.

Für die anschließende FACS-Analyse wurden diese mit Antikörper gefärbt und einer Erythrozyten-Lyse unterworfen.

Bei der Herzpunktion wird die Maus, nach einer Betäubung mit Enfluran, durch einen Genickbruch getötet und das Herz sofort nach Öffnen des Tiers mit einer Kanüle punktiert. Dadurch konnte bis zu 1ml Blut entnommen werden. Heparin wurde als Anti-Koagulans eingesetzt.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde von den Proben, die Lymphozyten enthielten, zuerst der Fc-Teil mit dem Antikörper 2.4 G2 blockiert. Zur Detektion der murinen Spender-T-Zellen allein wurden die blockierten Proben mit dem konjugierten Antikörper 2F5/ PE und CD3/Cy5 angefärbt. Nach der Erythrozyten-Lyse und Fixierung der Lymphozyten mit der Callyse-Lösung wurden die Zellen gewaschen und durchflusszytometrisch gemessen.

4.4.4 Tötung und Sektion der Tiere

Die Opferung der offensichtlich erkrankten Tiere sowie Spendertiere erfolgte nach einer Narkose mit Enfluran durch Genickbruch. Die toten Tiere wurden in Rückenlage fixiert und nach Desinfektion mit 70% Alkohol geöffnet. Nach einem Schnitt von caudal nach cranial wurde zunächst das Fell von der Bauchdecke möglichst ohne Schaden entfernt, um die inguinalen Lymphknoten isolieren zu können. Nach Öffnen der Bauchdecke wurden alle makroskopischen Auffälligkeiten der inneren Organe

dokumentiert und für die weiteren Untersuchungen einige Organe, wie Milz und Lymphknoten entfernt. Die Organe wurden vor weitere Untersuchungen in PBS überführt und auf Eis gelagert.

5 Ergebnisse

5.1 Übersicht der SIN Vektoren

Die 5 unterschiedlichen SIN Vektoren wurden schon von der Arbeitsgruppe von Laer kloniert und für die folgende Arbeit zur Verfügung gestellt. Als Kontrollvektor wurde M87o, ein klassischer gammaretroviraler Vektor, verwendet. Die Übersicht der Vektoren ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Die hier verwendeten gammaretroviralen SIN Vektoren enthielten die Transgenkassette des M87o-Vektors, den SV40 Enhancer und den SRSV Promotor statt MPSV (Myeloproliferatives Sarcoma Virus)-Promotor in der 5'LTR-Region. Als internen Promotor enthielten die SIN Vektoren entweder den zellulären Promotor von EF1 α (Elongationsfaktor 1 alfa) oder den viralen Promotor aus SFFV (Speen Foamy Foming Virus), die die Transgenexpression ermöglichten. Für beide Promotoren wurden je zwei Vektoren, einer mit und einer ohne den HS4 Insulator in der 3'LTR (Long Terminal Repeats), getestet (EF-C46, EF-C46-In, SF-C46, SF-C46-In). Einer der Vektoren, EF-C46-Sa, besaß den zellulären Promotor von EF1 α als internen Promotor und anstatt wPRE ein SAR-Element.

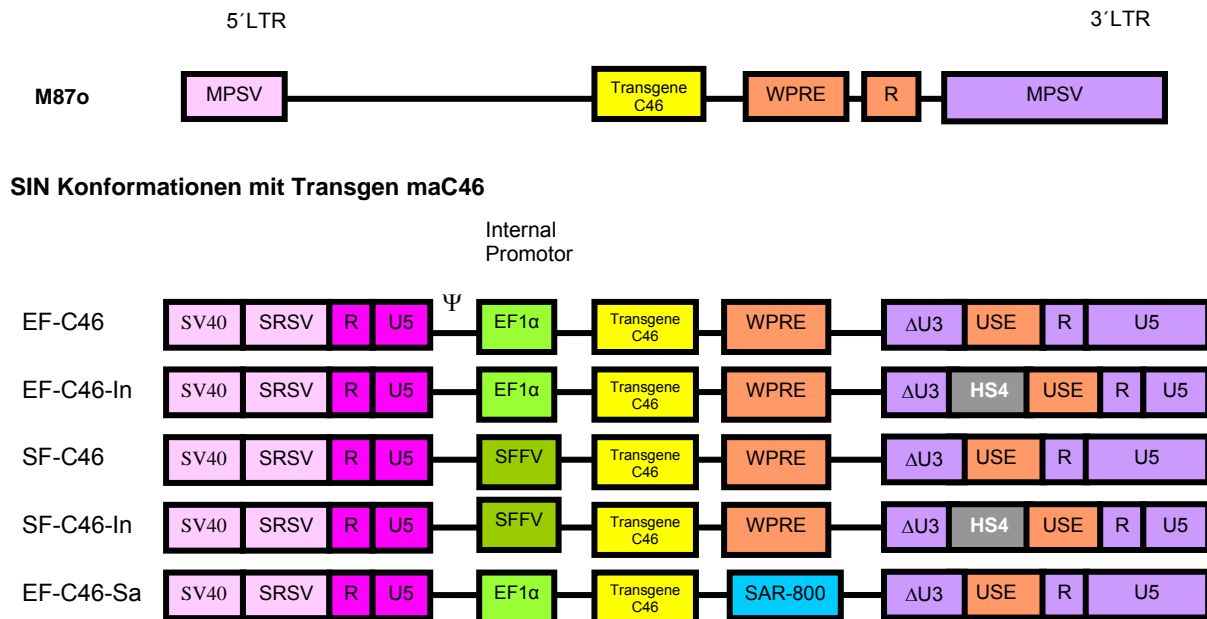


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung der verwendeten SIN Vektoren und des Kontrollvektors M87o, M87o ist ein konventioneller, LTR-getriebener gammaretroviraler Vektor. MPSV: Myeloproliferatives Sarcoma Virus, LTR: long terminal repeats-Region, WPRE: posttranskriptionell regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus, RRE: responsive element -decoy, SV40: Simian Virus 40 (Schambach 2007) als Enhancer, SRSV: Promotor in LTR, Ψ : Verpackungssignal, HS4: Insulator, SAR: Scaffold Attachment Region, Δ U3: deletierte U3, R: R Region in long terminal repeats, USE: upstream sequential element, EF1 α : Elongationsfaktor, SFFV: spleen focus forming Virus

5.2 Test der SIN Vektoren in der Zelllinie PM-1

Um die 5 SIN Vektoren mit dem maC46 Transgen zu testen, wurden die unterschiedlichen SIN Vektoren und der LTR-getriebene konventionelle gamma-retrovirale Vektor (M87o) zuerst in die humane T-Zelllinie PM-1 transduziert. Dabei wurden zum einen die Titer der Vektoren untereinander verglichen und zum anderen die Expressionsstärke des Transgens untersucht.

5.2.1 Bestimmung des Virustiters

Durch eine transiente Transfektion wurden replikationsinkompetente Vektorpartikel hergestellt und danach auf PM-1 Zellen titriert. 4 Tage nach der Transduktion wurde das C46 Peptid auf der Zelloberfläche durch eine Immunfärbung detektiert. Die Anzahl der transgenpositiven Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen. Aus der

Menge an transgenpositiven Zellen konnte der Titer des Virusüberstandes (Anzahl infektiöser Partikel/ml) berechnet werden. Der durchschnittliche Virustiter betrug ca. $3,2 \times 10^4$ pro ml Überstand (s. Abbildung 5.2.1).

Die Bestimmung der Titer der Vektoren war wichtig, um in den folgenden Experimenten für alle Vektoren die gleiche MOI (multiplicity of infection) einsetzen zu können.

Den höchsten Titer hatte der Kontrollvektor (M87o) mit 39200 Viruspartikel pro ml Überstand. SF-C46-In folgte diesem mit 37860 Partikel pro ml und nach ihm EF-C46-In mit 36020 pro ml. Der Vektor mit dem SAR-Element (EF-C46-Sa) zeigte den niedrigsten Titer mit 26140 Partikel pro ml. Die Insulator tragenden SIN Vektoren (EF-C46-In und SF-C46-In) hatten ähnlich hohen Titer wie der LTR-getriebene Kontrollvektor M87o (siehe Abbildung 5.2.1).

Hier wurde beobachtet, dass die SIN-Konfigurationen den Titer für den Transgen C46 nicht stark beeinflusste. Außerdem schnitt der Titer von den Vektoren mit Insulator sowohl beim zellulären als auch beim viralen Promotor etwas besser ab als ohne Insulator.

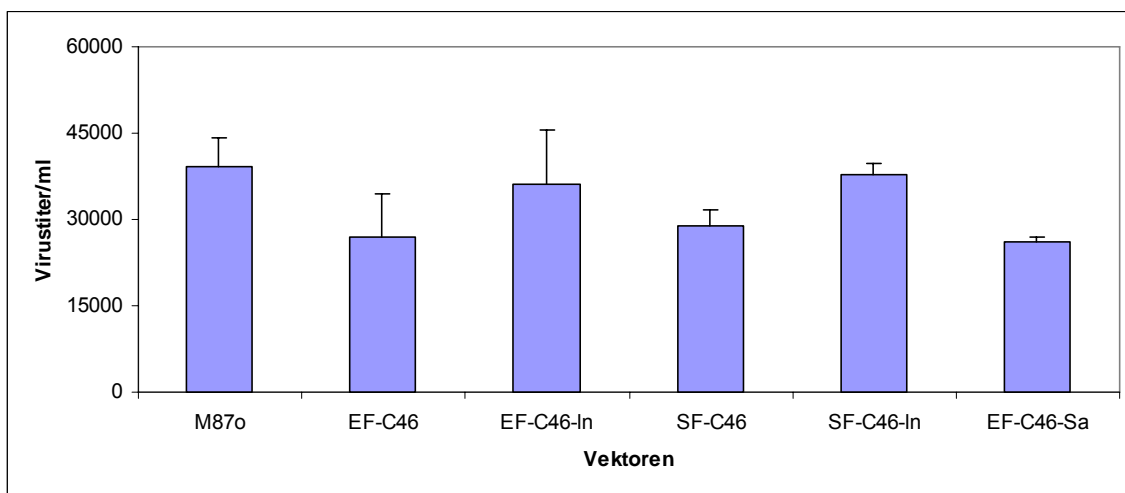


Abbildung 5.2.1 Vergleich der Vektortiter; Titer verschiedener retroviraler Vektoren auf PM-1 Zellen. y-Achse: Anzahl der Viruspartikel pro ml Überstand, x-Achse: Vektoren

5.2.2 Expressionsstärke der SIN Vektoren in humanen Zelllinien

Als nächstes wurden die Vektoren in der humanen Zelllinie PM-1 getestet. Die Expressionstärke des Transgens auf der Zelloberfläche wurde bestimmt, um die

unterschiedlichen Elemente der Vektoren miteinander zu vergleichen. Die Expressionsstärke der Vektoren wurde durchflusszytometrisch über die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen nach Immunfärbung bestimmt.

Die mittlere Fluoreszenzintensität der SIN Vektoren war deutlich niedriger als die des konventionellen gammaretroviralen (LTR-getriebenen retroviralen) Vektors M87o. M87o hatte eine mittlere Fluoreszenzintensität von 1900. SF-C46 und SF-46-In folgten ihm mit 346,5 bzw. 253,8.

Die Vektoren mit dem viralen SFFV Promotor (SF-C46, SF-C46-In) exprimierten deutlich stärker als die EF1 α getriebenen Konstrukte (EF-C46, EF-C46-In, EF-C46-Sa) (SF-C46: 346.5, SF-C46-In: 253.8, EF-C46: 91,94, EF-C46-In: 52.25). Dabei zeigten die beiden Vektoren mit Insulator, SF-C46-In und EF-C46-In, eine geringere Expressionsstärke als die Vektoren gleichen Promotors ohne Insulator. EF-C46-Sa, der den Promotor EF1 α und statt wPRE ein SAR-Element hat, zeigte die niedrigste Fluoreszenzintensität mit 19,26. EF-C46-Sa, der anstelle des wPRE ein SAR-Element enthält, hatte im Vergleich zu dem korrespondierenden Vektor mit wPRE, EF-C46, eine nochmals reduzierte Expressionsstärke (s. Abb.5.2.2).

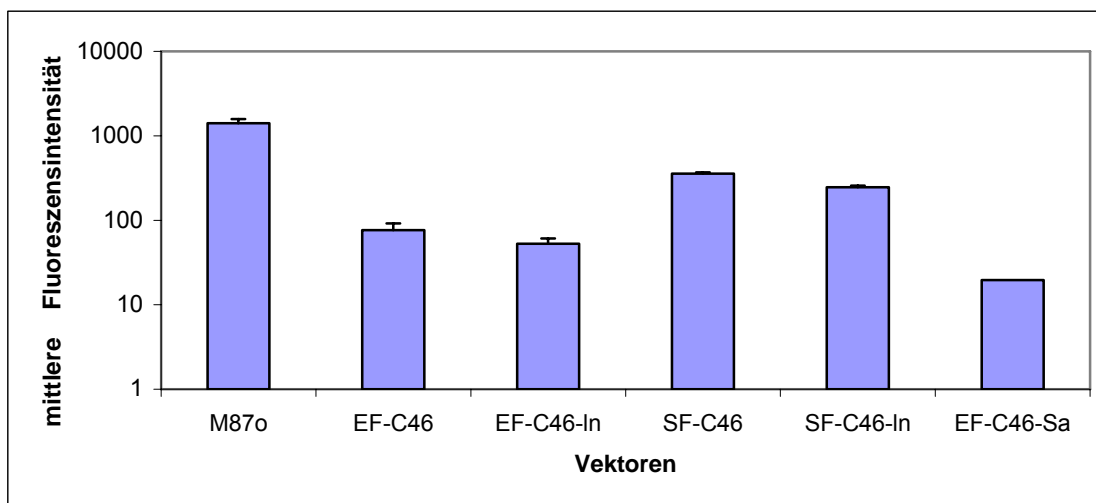


Abbildung 5.2.2 Vergleich der Expressionsstärke der Vektoren in PM1 Zellen.

Die retroviralen Vektoren wurden in PM-1 Zellen transduziert. M87o ist ein konventioneller retroviraler Vektor und wird hier als Positivkontrolle verwendet. y-Achse: Werte wurden logarithmisch aufgetragen.

5.3 Langzeitexpression der SIN Vektoren in primären humanen T-Zellen

Zielzellen einer Gentherapie der HIV-Infektion mit maC46 sind humane T-Helferzellen. Für eine effektive antivirale Wirkung bei einer Gentherapie der HIV-Infektion ist die

langanhaltende Expression des C-46 Peptids nach der Transduktion wichtig. Daher wurde in den folgenden Experimenten die Stärke der Transgenexpression der Vektoren und deren Langzeitverlauf in primären humanen T-Zellen untersucht.

Die primären humanen PBL (periphere Blut-Lymphozyten) wurden aus Buffy-Coat-Blutkonserven über einen Dichtegradienten isoliert und die T-Zellen wurden in vitro stimuliert. Beginnend am 4. Tag nach der Transduktion wurden die Zellen jeden 2. Tag durchflusszytometrisch auf ihre C-46 Peptid-Expressionen hin untersucht. In diesem Experiment wurde der Vektor MP71-GFP, der den Marker GFP enthält, als zusätzliche Positivkontrolle verwendet.

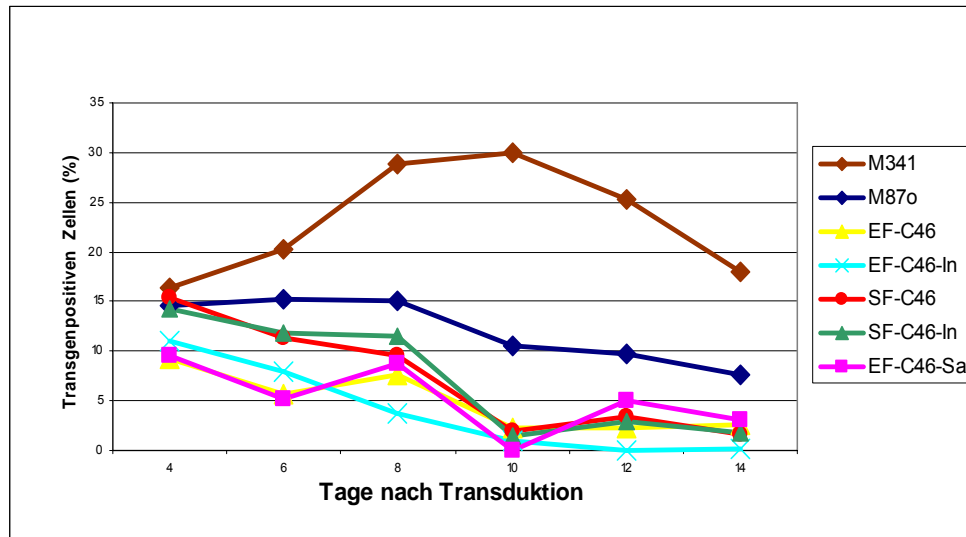
Der prozentuale Anteil der transgenpositiven Zellen ist in der Abbildung 5.3.1.A dargestellt. Der in dieser Abbildung eingetragene prozentuale Anteil der transgenpositiven Zellen ist die Differenz zwischen dem tatsächlich gemessenen Wert und dem Wert der nicht transduzierten Proben (negative Kontrolle), der als Hintergrund der Färbung abgezogen wurde. In der Abb. 5.3.1.B sind die Werte relativ zu den Daten vom 4. Tag nach der Transduktion angegeben.

Bei allen Vektoren außer MP71-GFP sank der Anteil der transgenpositiven T-Zellen über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum nach der Transduktion stark ab.

Bei der Positivkontrolle mit dem Vektor MP71-GFP mit GFP-Marker lag der Anteil transgenpositiver Zellen deutlich höher als bei den anderen Vektoren. M87o, SF-C46 und SF-C46-In hatten eine niedrigere Transduktionseffizienz als MP 71-GFP, während EF-C46, EF-C46-In und EF-C46-Sa die niedrigsten hatten.

M87o zeigte im Verlauf eine stabilere Transgenexpression als die 5 SIN Vektoren. Bei SF-C46 und SF-C46-In verringerten sich die Transgenexpressionen bis zum 8.Tag nach der Transduktion leicht und fielen danach stark ab. Auch bei den korrespondierenden Vektoren mit zellulärem EF1 α Promotor nahm die Transgenexpression über den Beobachtungszeitraum stetig ab. Auch bei EF-C46-Sa sank die Transgenexpression mit kleineren Schwankungen in der Summe. Am ehesten zeigte EF-C46-Sa jedoch nach MP71-GFP und M87o die stabilste Transgenexpression. Insbesondere am 12. Tag der Transduktion stieg die Kurve von EF-C46-Sa wieder (s. Abbildung 5.3.1 A).

A



B

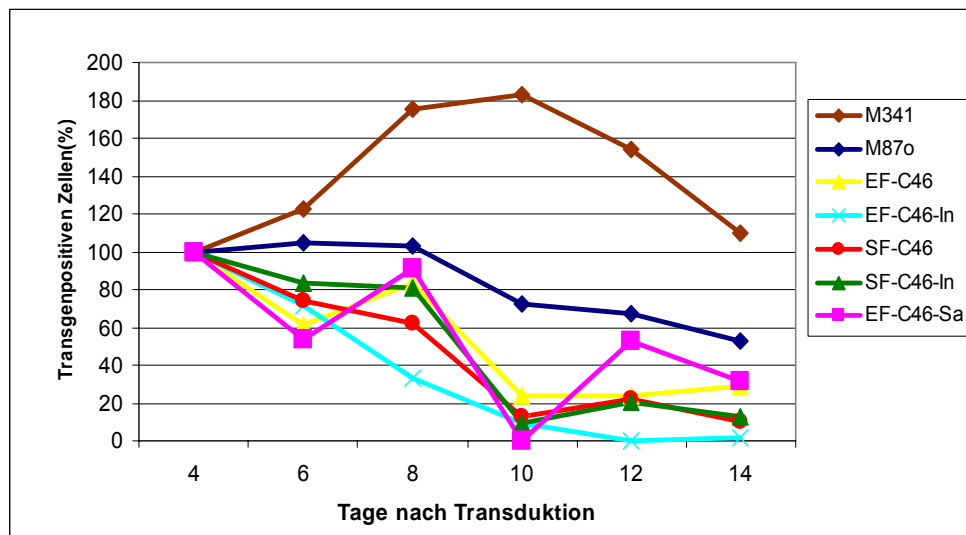


Abbildung 5.3.1 Langzeitverlauf transgenpositiver Zellen in primären humanen T-Zellen A. Der absolute Anteil transgenpositiver Zellen: Nach der Transduktion der T-Zellen wurde der Anteil maC46 exprimierter T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. TD: Transduktion, PBL: Periphere Blut-Lymphozyten B. Der relative Anteil transgenpositiver Zellen: relative Veränderung zum Anfangswert [in %]. M341: MP71-GFP, der den Markergen GFP und gleichen Transgen maC46 enthält, wurde als zusätzliche positivkontrolle verwendet.

Als nächstes wurde die Expressionsstärke der Transgenexpression der Vektoren und deren langzeitiger Verlauf in primären humanen T-Zellen untersucht. Durch FACS-Messung wurde wie auch bei den PM-1 Zellen die mittlere Fluoreszenzintensität der transgenpositiven Zellen detektiert.

Die Expressionsstärke der Vektoren in primären T-Zellen standen im gleichen Verhältnis wie die in PM-1 Zellen. Jedoch war die Expressionsstärke generell in den

primären T-Zellen viel geringer. Wie in Abbildung 5.3.2 zu sehen ist, zeigte M87o am 4.Tag nach der Transduktion die stärkste mittlere Fluoreszenzintensität mit 409. Ihm folgten SF-C46 mit 70,5 und SF-C46-In mit 64,4 (bei PM-1 Zellen M87o: 1963, SF-C46: 346,5, SF-C46-In: 253,8). Alle drei Vektoren mit zellulären internen EF1 α Promotor zeigten eine so niedrige Expressionsstärke (im Hintergrund der Färbung), dass sie hier nicht berücksichtigt werden konnten.

Bei dem Kontrollvektor M87o war die mittlere Fluoreszenzintensität am 4.Tag nach der Transduktion am stärksten und fiel danach über die Zeit bis zum 14.Tag stark ab.

Die Vektoren SF-C46 und SF-C46-In zeigten, obschon ihre Ausgangswerte niedrig waren, bis zum 14.Tag nach der Transduktion gleichbleibende mittlere Fluoreszenzintensität mit nur leichten Schwankungen (Abb.5.3.2).

Konstrukte mit Insulator waren ebenso vom Verlust der Expression betroffen wie Konstrukte ohne Insulator.

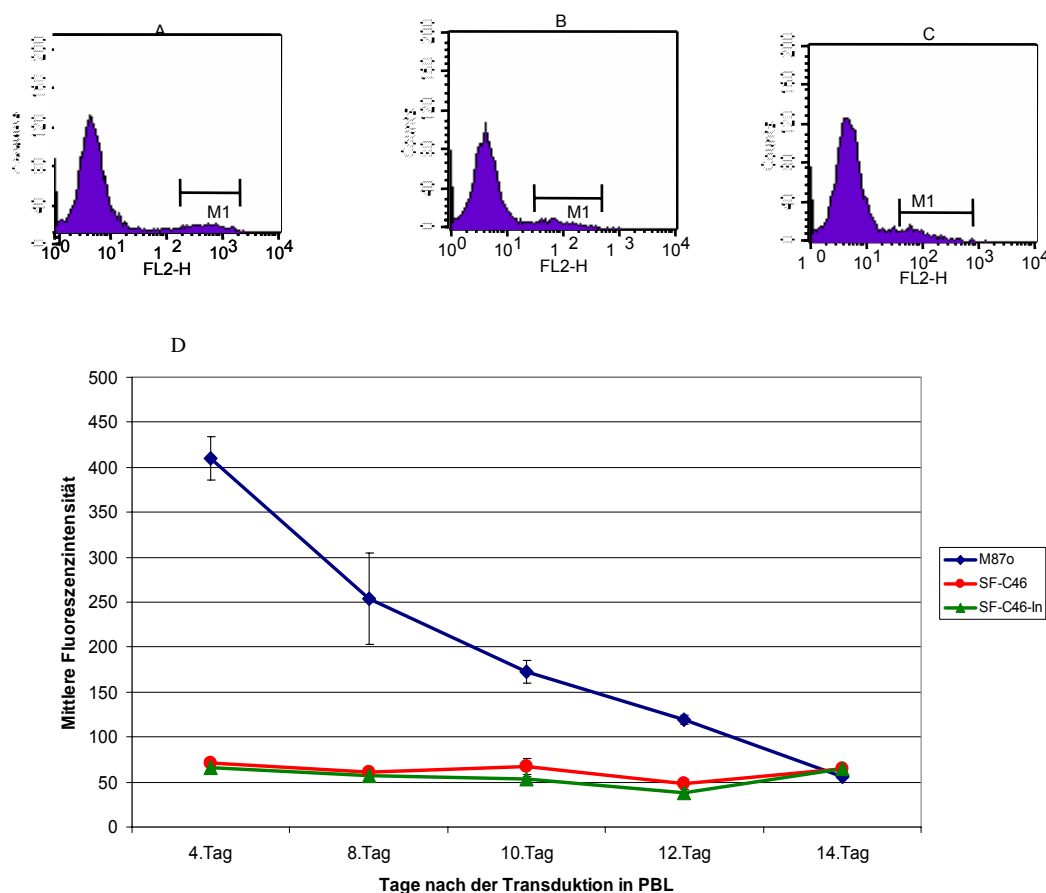


Abbildung 5.3.2 Langzeitverlauf der Expressionsstärke des maC46-Peptids in primären humanen T-Zellen: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Vektoren M87o, SF-C46 und SF-C46-In, A: M87o, 4.Tag nach der Transduktion. B: SF-C46, 4.Tag nach der Transduktion. C: SF-C46-In 4.Tag nach der Transduktion. D: Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 14 Tagen, PBL : Periphere Blut-Lymphozyten.

5.4 Expression der SIN Vektoren in vivo im syngenischen Mausmodell

5.4.1 Transduktion der Mauszelllinie SC-1

In dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, wie sich die Expression und die Verbreitung der transgenpositiven T-Zellen in vivo verhalten.

Als erstes wurden die Überstände der SIN Vektoren auf die Mauszelllinie SC-1 titriert. Danach wurden primäre murine T-Zellen transduziert. Dann wurden die transduzierten T-Zellen in die Rag 1 Knockout Mäuse transplantiert und der Verlauf der Expression sowie der Anteil der transgenpositiven Zellen in vivo beobachtet.

Zur Herstellung der viralen Partikel wurde auch das drei-Plasmid-System für die Verpackung verwendet. Dabei wurde das ecotrope Env Plasmid (M187) zur Überstandsherstellung auf der Zelllinie 293T Zelle genutzt. Die produzierten Vektorpartikel wurden dann auf der murinen Zelllinie SC-1 titriert. Die Transgen exprimierenden Zellen wurden durch die Immunfärbung detektiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Die Transduktionseffizienz war bei allen Vektoren mit durchschnittlich 40,5% insgesamt besser als im Vergleich zur PM-1 Zelllinie mit amphotrope Env, GALV Hüllprotein M130 (bei PM-1 mit GALV env : durchschnittlich 16,2%). MP71-GFP zeigte 75.5% C46 exprimierende Zellen, M87o 57.6%, EF-C46 32.5%, EF-C46-In 8.29%, SF-C46 49.3%, SF-C46-In 47.7% und EF-C46-Sa 13.5%.

Die Expressionsstärke zeigte ein ähnliches Verhältnis wie in PM-1 Zellen (Abb.5.2). Am stärksten exprimierten M87o und MP71-GFP mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 509,7 und 546,6. Die Vektoren mit viralem Promotor folgten mit einem deutlichen Abstand (SF-C46: 268 und SF-C46-In: 134.2). Die Vektoren mit zellulärem Promotor exprimierten am schwächsten (EF-C46: 23.4 ; EF-C46-In 42.4 und EF-C46-Sa 21.3).

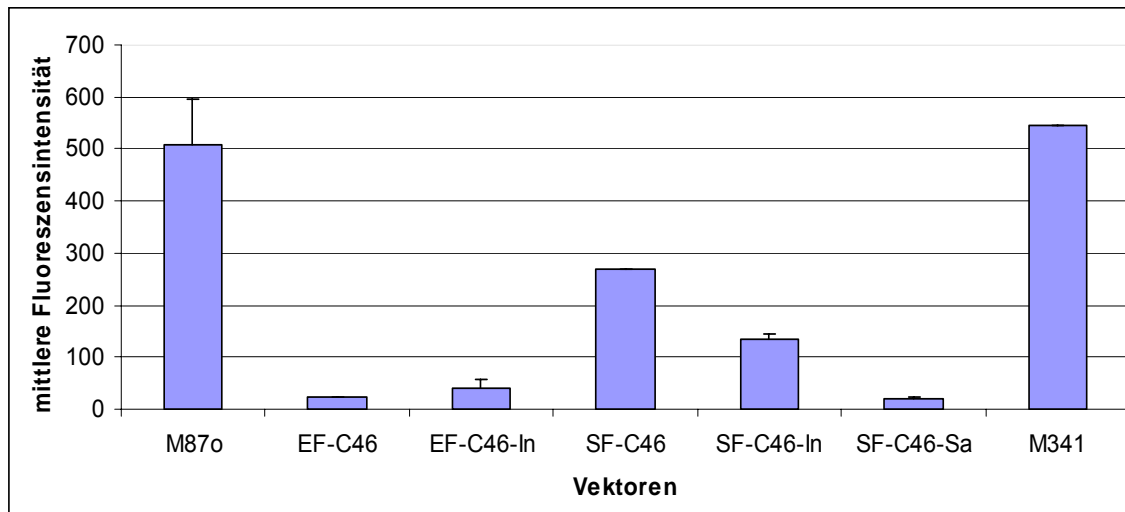


Abbildung 5.4.1 Die Expressionsstärke der verschiedenen Vektoren nach der Transduktion von SC-1 Zellen. MP71-GFP (M341) enthält grün fluoreszendierendes Peptid (GFP) als Markergen.

5.4.2 Bestimmung der Expression des Transgens in primären murinen T-Zellen

Für das in-vivo-Experiment wurden primäre murine T-Zellen mit den Versuchsvektoren transduziert. Diese transduzierten Zellen wurden später in die Rag 1 Knockout Mäuse transplantiert.

Beim nächsten Versuch wurden primäre murine T- Zellen mit den 5 SIN Vektoren und den beiden Vektoren M87o und MP71-GFP als Positivkontrollen transduziert. Dabei sollte untersucht werden, wie die Transduktionseffizienz bei den jeweiligen Vektoren ist und wie hoch das Expressionsniveau des Transgens C46 liegt.

Die primären T-Zellen wurden aus der Milz und den Lymphknoten einer Wildtyp-Maus (Stammnahme C57BL/6-Ly 5.1) isoliert. Nach der Stimulierung mit anti CD3 und anti CD28 beschichteten Partikel und IL2 wurden die Zellen an zwei aufeinander folgenden Tagen mit den Überständen, der 5 SIN Vektoren und 2 Kontrollvektoren (M87O und MP71-GFP) transduziert.

Die Transduktionseffizienz wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit 2F5 und a-Human IgG/ PE gemessen. Der Hintergrund der Färbung war mit 0.4% relativ niedrig (siehe Abb. 5.4.2.A.).

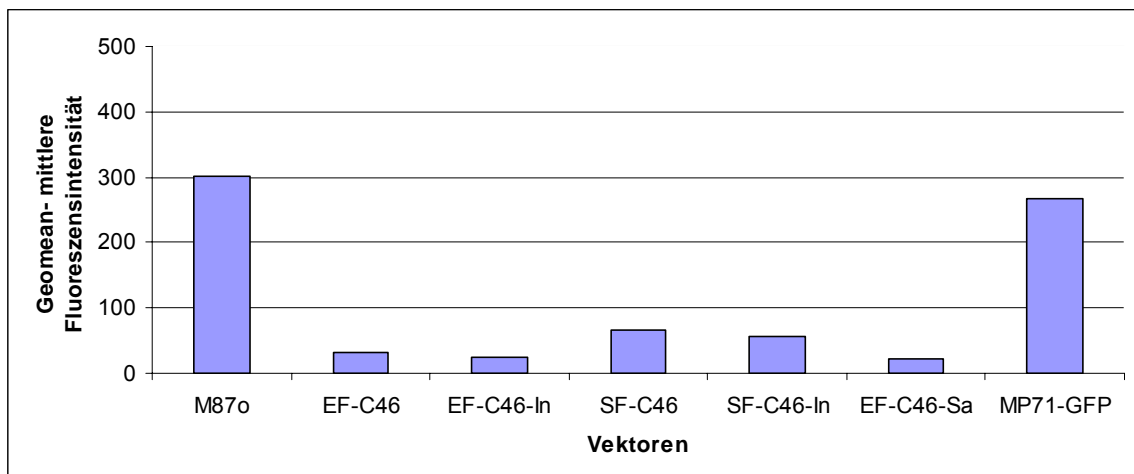
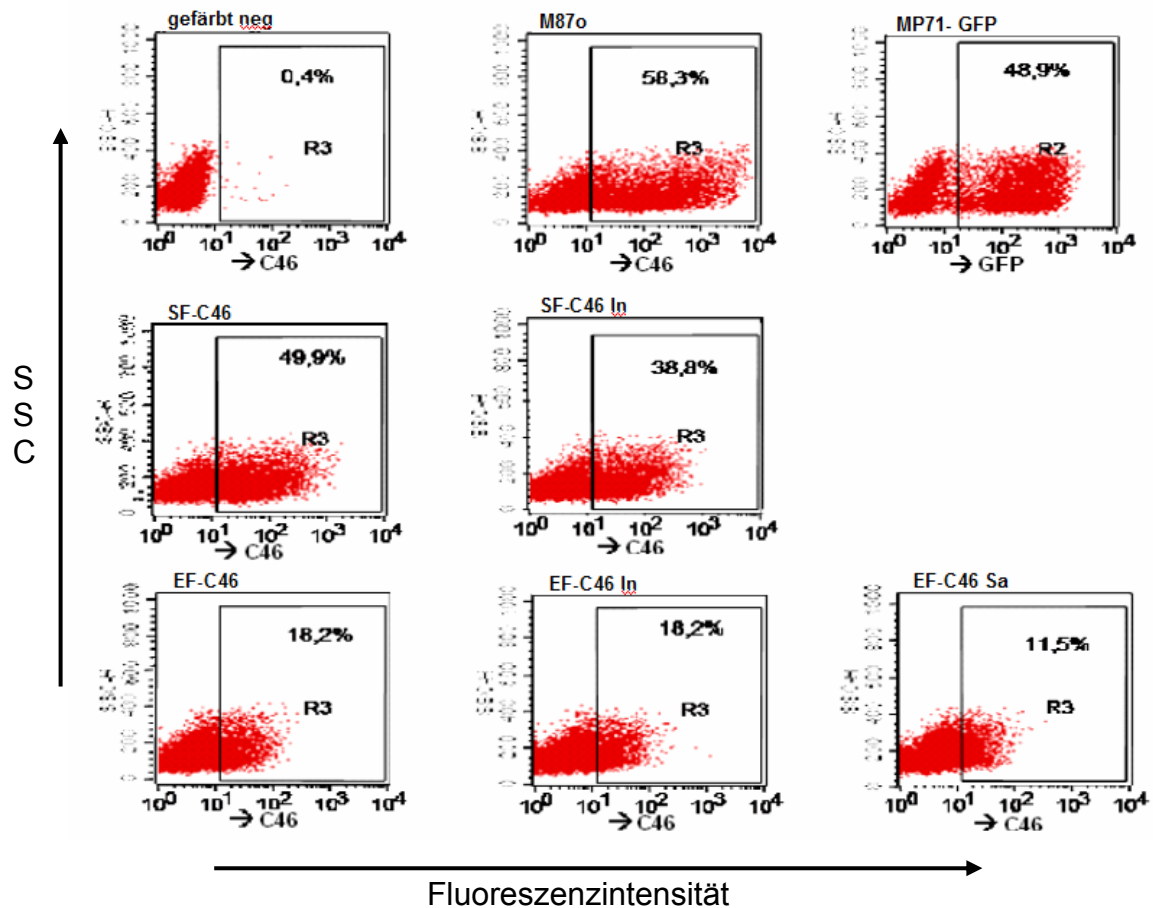


Abbildung 5.4.2 A: FACS-Bilder der murinen T-Zellen gefärbt. neg.: Probe von nicht transduzierten T-Zellen, R: transgenpositive Zellen. **B:** Expressionsstärke der Vektoren in murinen T-Zellen.

Der Anteil der transgenpositiven Zellen war im Allgemeinen niedriger als bei der SC-1 Mausfibroblasten Zelllinie, die zur Titration der Vektoren benutzt worden war. Er betrug bei MP71-GFP 48.9% und beim Vektor M87o 58.3%. Bei Vektoren EF-C46 und EF-

C46-In zeigte sich ein 18.2%-iger sowie 18.2%-iger Anteil. Bei den Vektoren SF-C46 und SF-C46-In lag der Anteil bei 49.9% sowie bei 38.8%. Bei EF-C46-Sa war er mit 11.5% am niedrigsten (s. Abbildung 5.4.2. A). Mit den verschiedenen Vektoren wurden leider stark unterschiedliche Anteile an transgenpositiven Zellen erzielt, was den Vergleich der Expression nach der Transplantation erschwerte.

Die Expressionsstärke der Vektoren untereinander zeigte bei den primären Maus T-Zellen ähnliche Verhältnisse wie bei humanen PM-1 und murinen SC-1 (s. Abbildung 5.4.2 B). M87o zeigte mit 302.58 die stärkste Fluoreszenzintensität, gefolgt von MP71-GFP mit 265.96. Bei EF-C46 und EF-C46-In war die Expressionsstärke sehr niedrig (31.18 und 24.63). SF-C46 und SF-C46-In hatten eine geringfügig höhere Fluoreszenzintensität (67.32 und 55.64). Der Vektor EF-C46-Sa, der einen internen Promotor EF1 α und das SAR-Element enthält, zeigte die niedrigste Intensität (21.26). Das SAR-Element schien auch in diesem Versuch keinen positiven Einfluss auf die Expressionsstärke vom Transgen C46 zu haben.

5.5 Transplantation der transduzierten primären Maus T-Zellen in Rag 1 Knockout Mäusen

Um den Verlauf der Expression der einzelnen Vektoren in vivo zu beobachten, wurden die transduzierten T-Zellen nun intraperitoneal in immundefiziente Mäuse transplantiert und über einen Zeitraum von 60 Tagen untersucht. Rag 1 Knockout Mäuse haben selbst keine reifen B- und T-Zellen.

Hier wurde ein syngenes Mausmodell verwendet, indem Zellen aus einer C57 BL/6 Maus isoliert und in eine Rag-1^{-/-} Maus, ebenfalls BL/6 Ursprungs, transplantiert wurden.

5.5.1 Entwicklung der Expression von C46 in vivo über einen Zeitraum von 60 Tagen nach der Transplantation

In der vorliegenden Arbeit wurde in vitro mit humanen T-Zellen der Langzeitverlauf der Expressionsstärke des Transgens C46 von 5 SIN Vektoren beobachtet. Nun wurde untersucht, wie lange transplantierte T-Zellen in vivo in einem syngenen Mausmodell

das Transgen exprimieren können. Dabei sollten die Vektoren mit unterschiedlichen Elementen auf die Expressionsstärke und -dauer hin verglichen werden.

Nach der Transplantation wurde aus der Schwanzvene über den Zeitraum von 60 Tagen zweimal Blut entnommen (am 28. und 36. Tag nach der Transplantation) und auf das Transgen gefärbt, um die Expression der Vektoren in vivo zu verfolgen. 60 Tage nach der Transplantation wurden die Mäuse geopfert.

In Abbildung 5.5.1.A. ist der Anteil der transgenpositiven T-Zellen innerhalb der Spenderzellen im Blut aufgetragen.

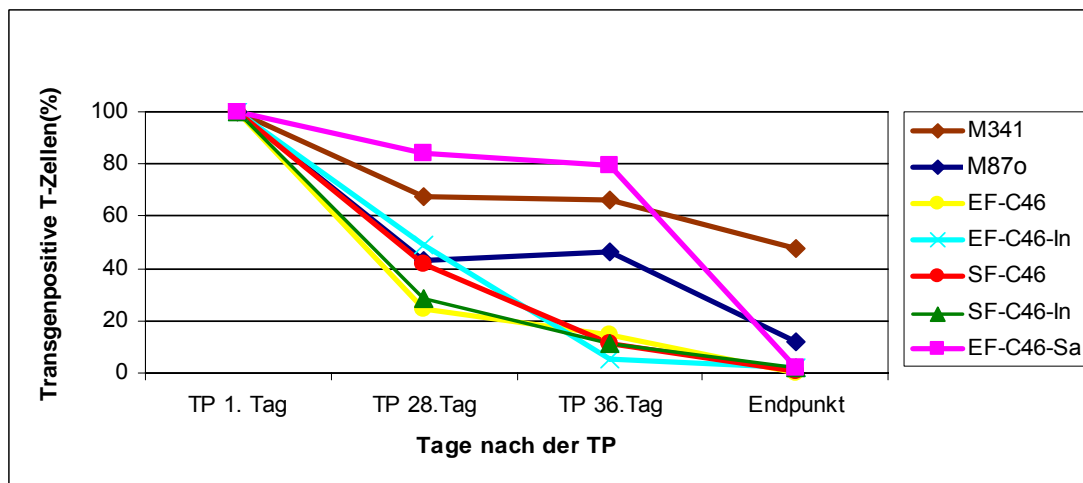
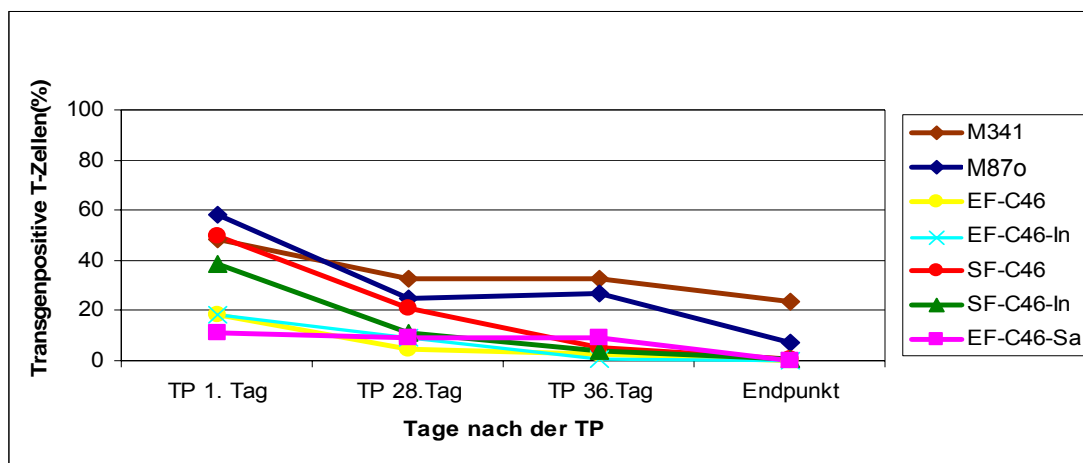


Abbildung 5.5.1 Verlauf der Transgenexpression in den transplantierten Mäusen über den Zeitraum von 60 Tagen. A. Absolute Menge: Die Abbildung zeigt den Verlauf der Transgenexpression in absoluter Menge nach der Maus-Transplantation. Je ein Vektor wurde in zwei Mäuse transplantiert. Die Werte in der Grafik zeigen die Mittelwerte von beiden Mäusen. TP: Transplantation. B. Relative Menge : nominiert auf Transgenexpression am 1.Tag nach Transplantation. Die Abbildung zeigt den Verlauf der C46- Expression in vivo relativ zur Transduktionseffizienz. Endpunkt: 60.Tag nach der Transplantation. M341: MP71-GFP

Um diese Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Abnahme der transgenpositiven Zellen relativ zur anfänglichen Transduktionseffizienz dargestellt (Abb 5.5.1 B). Hier zeigte sich die Expression vom Vektor EF-C46-Sa relativ stabil bis zum 36.Tag nach der Transplantation, fiel danach aber stark ab. Bei M87o und MP71-GFP war die Expression am stabilsten. Doch auch dort wurden die Vektoren zum Teil herunterreguliert. Die Expression der übrigen Vektoren nahm über die Zeit stark ab, bis schließlich nach 60 Tagen nahezu keine Expression mehr nachgewiesen werden konnte.

5.5.2 Transgenexpression am Tag der Endanalyse

60 Tage nach der Transplantation wurden die mit transduzierten T-Zellen transplantierten Mäuse getötet. Die Milz und die Lymphknoten aller mit T-Zellen transplantierten Mäuse waren im Vergleich zu den nicht transplantierten Mäusen leicht vergrößert. Zellen aus Milz und Lymphknoten der Mäuse wurden vor der Färbung vereinzelt. Die Zellen aus Blut, Milz und Lymphknoten der Mäuse wurden mit den durch Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern (2F5-PE und anti-CD3-Cy5) gefärbt. Anschließend wurden alle Proben im FACS analysiert. Bei einer Maus, in die die mit dem Vektor SF-C46-In transduzierte T-Zelle transplantiert wurde, konnten die Daten aufgrund technischer Probleme nicht ausgewertet werden.

Als Negativkontrolle wurden Proben von den mit nicht transduzierten T-Zellen transplantierten Mäusen mit den gleichen Antikörpern gefärbt. Der Hintergrund der C46 Färbung lag im Blut bei 0.38%, in der Milz bei 25.7% und in den Lymphknoten bei 6.6%. Dieser Hintergrund wurde von jedem Messwert abgezogen. In der Milz war der Hintergrund bei der Maus mit der Nummer 9514 höher als der Messwert.

Die Expression des GFP-Vektors (MP71-GFP) war in allen Kompartimenten kontinuierlich hoch, insbesondere bei Blut- und Lymphknotenproben, und zeigte einen geringen Rückgang im Vergleich zum Transplantat (s. Abbildung 5.5.2 A). Außer bei M87o und MP71-GFP waren bei allen anderen Vektoren im Blut keine transgenpositiven T-Zellen nachweisbar. Aber auch bei M87o und MP71-GFP nahm der Anteil an transgenpositiven Zellen im Zeitverlauf ab, bei M87o um ca. 90% und bei MP71-GFP um ca. 60% des Ausgangswertes.

In diesem Versuch zeigte nur EF-C46-Sa, der statt wPRE ein SAR-Element hat, bei beiden Mäusen ein positives Ergebnis bei einer langanhaltenden Expression. Trotz ihres niedrigsten Ausgangsanteils an transgenpositiven T-Zellen zeigten die Lymphknotenproben der Mäuse, in die die mit dem Vektor EF-C46-Sa transduzierten T-Zellen transplantiert wurden, bei der Endanalyse den ca. 60%-igen Anteil.

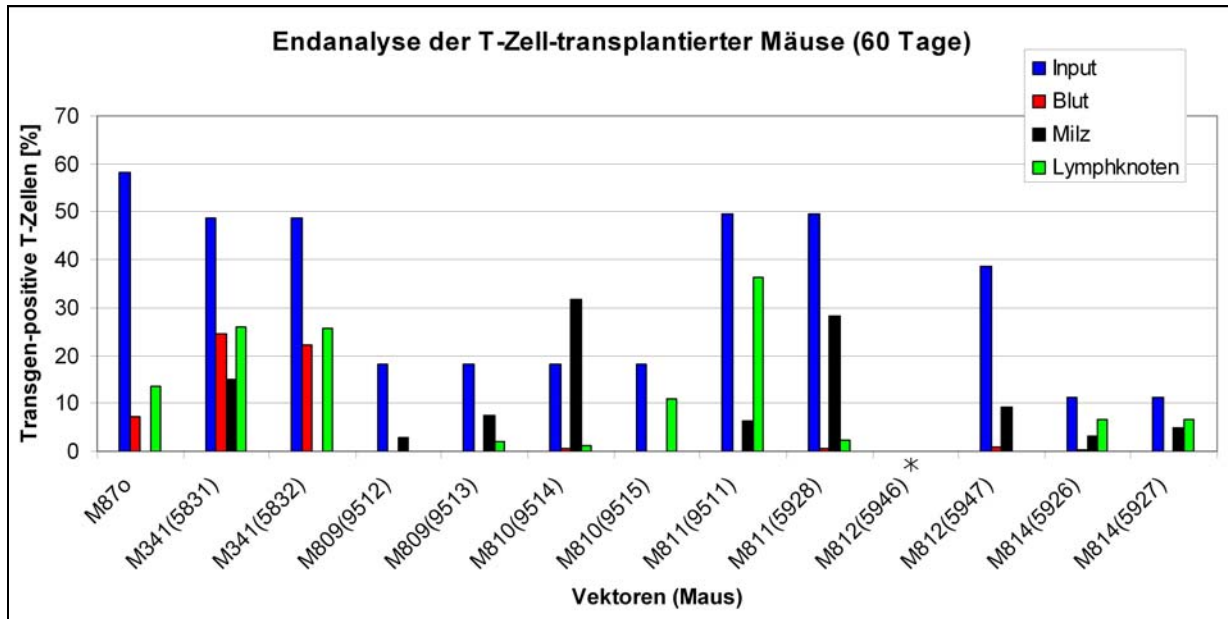
Von den Mäusen, denen mit den Vektoren EF-C46-In und SF-C46 transduzierte T-Zellen transplantiert wurden, war bei einer Maus je Vektor am Versuchsende im Lymphknoten über 60% des Inputs übrig geblieben.

Die Abbildung 5.5.2 A erfasst den Anteil transgenpositiver T-Zellen im Transplantat und im Blut, Milz und Lymphknoten der Mäuse zum Zeitpunkt der Endanalyse.

Um diese Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden die Anfangsdaten (blau dargestellt) als Grundwerte genommen, die Endpunktwerte relativ dazu umgerechnet und in Abbildung 5.5.2 B dargestellt.

Bei Lymphknotenprobe zeigten sich bei zwei Mäusen mit MP71-GFP, bei einer Maus mit EF-C46-In und einer Maus mit SF-C46 sowie bei zwei Mäusen mit EF-C46-Sa ca. 60% der transplantierten T-Zellen als transgenpositiv. Bei den Blutproben der SIN Vektor-transplantierten Tiere waren die transgenpositiven T-Zellen bei der Endanalyse sehr gering mit unter 5% des Ausgangswertes, während die beiden Proben der MP71-GFP-transplantierten Tiere ca. 40% des Inputs aufwiesen. In der Milz von EF-C46 und SF-C46 sowie EF-C46-Sa-transplantierten Tieren zeigten die transgenpositiven T-Zellen mehr als 20% des Inputs. Die LTR-getriebenen Vektoren, wie M87o und MP71-GFP schnitten schlechter ab.

A



B

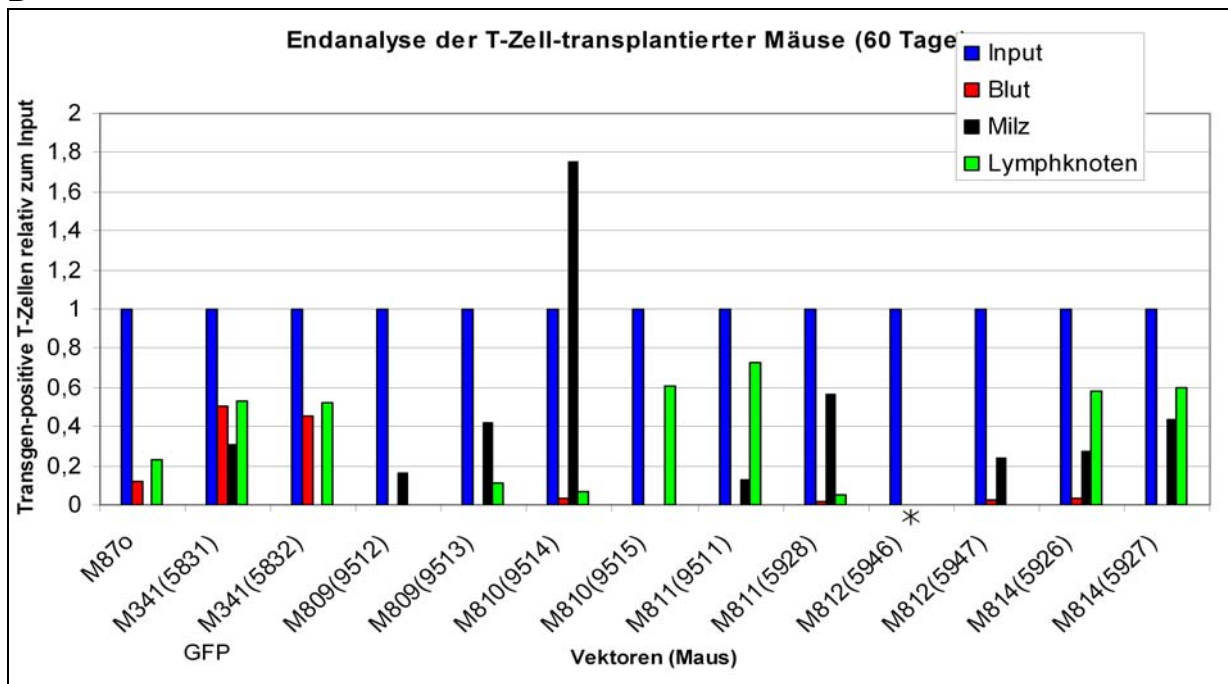


Abbildung 5.5.2 Endanalyse der T-Zell transplantierten Mäuse (60 Tage nach Transplantation) A. absoluter Wert : Die Abbildung zeigt den Anteil an transgenpositiven T-Zellen in den Organen der Mäuse. Die Anfangswerte wurden blau dargestellt. Der positive Anteil vom Endpunkt wurden bei der Blutprobe rot, bei der Milzprobe schwarz und bei der Lymphknotenprobe grün dargestellt. B. relative Werte zum Transplantat: Die Abbildung zeigt den Anteil an transgenpositiven T-Zellen in den Organen der Mäuse relativ zur Inputmenge. Die Inputmengen wurden blau, die Blutprobe rot, die Milzprobe schwarz und Lymphknotenprobe grün dargestellt. M341: MP71-GFP, M809: EF-C46, M810: EF-C46-In, M811: SF-C46, M812: SF-C46-In, M814: EF-C46-Sa, * markierte Proben wurden nicht analysiert.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich unterschiedlicher gammaretroviraler SIN Vektoren für das membranständige C-Peptid (maC46) mit dem konventionellen gammaretroviralen Vektor M87o in vitro und in vivo in einem syngenesis Mausmodell im Bezug auf ihre Transduktionseffizienz und Expressionsstärke sowie der Expressionsdauer der Vektoren. Untersucht wurde dabei der Effekt des internen Promotors, des Insulators und des SAR-Elements.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der Titer der SIN Vektoren mit wPRE ist vergleichbar mit dem des konventionellen gammaretroviralen Vektors M87o.
- Die Expressionsstärke der SIN Vektoren war in vitro und auch in vivo deutlich schwächer als die der konventionellen Vektoren.
- Die SIN Vektoren mit dem viralen internen SFFV Promotor exprimierten stärker als die mit zellulärem EF1 α Promotor.
- Der cHS4 Insulator hatte in dieser Arbeit keinen großen Einfluss auf Expressionsdauer.
- SIN Vektor mit SAR Element statt wPRE zeigte trotz niedrigen Titer und Expressionstärke eine stabilere und langanhaltende Expression in vivo als die anderen SIN Vektoren.

6.1 SIN Konfiguration mit maC46

Durch die Vektorintegration in eine ungünstige Region des humanen Genoms kommt es zur Entartung der Wirtszelle und angehäuft auch zur Leukämie (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003; Thrasher, Gaspar et al. 2006). Für eine erfolgreiche Gentherapie muss diese Gefahr der Insertionsmutagenese überwunden werden. Einen Weg, die

Biosicherheit der Gentherapie zu erhöhen, stellen die sogenannten self-inactivating (SIN) Vektoren dar. Für die Gentherapie wurden bereits in mehreren Studien das SIN Design als ein alternatives Vektorsystem erforscht. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde daher getestet, ob SIN Vektoren eine mögliche Alternative zur Expression von maC46 sind.

6.2 Die SIN Konfiguration beeinflusst den Titer nicht stark

Mehrere Studien beschrieben schon den niedrigen Titer und ein relativ schwaches Expressionslevel bei SIN Vektoren im Vergleich zu LTR-getriebenen retroviralen Vektoren (Baum, Dullmann et al. 2003; Kraunus, Schaumann et al. 2004; Werner, Kraunus et al. 2004). Die Titer der SIN Vektoren von üblicherweise mit 2×10^4 bis 1×10^5 Viruspartikel/ml sind somit zu niedrig für eine vernünftige Transduktion (Kraunus, Schaumann et al. 2004). Diese geringe Titermenge ist für eine therapeutische Anwendung der SIN Vektoren eine große Hürde, da für die ex vivo Transfektion große Vektormengen benötigt werden, um einen genügend großen Anteil der Spenderzellen genetisch zu modifizieren. Es wird nach verschiedenen transkriptionalen Regelementen gesucht, durch die dieses Problem überwunden werden kann. Posttranskriptionales Regelement (posttranscriptional regulatory element PRE) ist eines von den neueren Entdeckungen. Kraunus und seine Mitarbeiter experimentierten mit PRE aus Woodchuck Hepatitis Virus (wPRE). Sie zeigten, dass durch die Integration von Posttranskriptionalen Regelementen (PRE) der Virustiter soweit erhöht werden konnte, dass die Menge für die Infektion von primären Zellen ausreicht (Kraunus, Schaumann et al. 2004).

Die für die vorliegende Arbeit verwendete SIN Vektoren mit wPRE und SFFV (Spleen focus forming Virus) Promotor zeigten annähernd so hohen Titer wie die LTR-getriebenen Vektoren. Die Transduktionseffizienz von SIN SF Vektoren lag mit 49,9% knapp unter die von dem LTR-getriebenen Vektor M87o (58,3%). SIN Vektoren, die statt wPRE das SAR-Element enthielten, zeigten sehr niedrigen Titer und somit auch die niedrigste Transduktionseffizienz von 11,5% (Abb 5.2.1). Der niedrige Titer ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Deletion des TATA Boxes die 3'

Prozessierung verschlechtert (Miyoshi, Blomer et al. 1998). Wird die 3' Prozessierung durch wPRE verbessert, wird der Titer erhöht.

6.3 Expressionsstärke bei SIN Vektoren im Vergleich zum LTR-getriggerten Vektor

Ein anderer für die Gentherapie wichtiger Faktor ist die Stärke der Transgenexpression, weil die Stärke der Expression die Wirkung des antiviralen Gens bestimmt (Hermann, Martinius et al. 2009). Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Expressionsstärke der verschiedenen Vektorkonstrukte in humanen und murinen T-Zellen sowie primären Lymphozyten verglichen. Hier zeigten die SIN Konstrukte eine deutlich niedrigere Intensität als LTR-getriebene Vektoren. Von den SIN Vektoren zeigte der Vektor SF-C46 die höchste Fluoreszenzintensität, die dennoch knapp ein Sechstel von der des LTR Vektors betrug (Abb 5.2.2). Andere Vektoren, die statt des SFFV Promotors den zellulären EF1 α Promotor verwendeten oder kein PRE enthielten, schnitten noch schlechter ab. Die SIN Vektoren haben durch die Deletion von der Enhancer Promotor Sequenz in der LTR zwar ein verringertes Transaktivierungspotential, aber die ungünstige RNA Prozessierung führt zu geringere Transgenexpression als die der LTR Vektoren. Diese Differenz kann je nach Zelltyp variieren (Kraunus, Schaumann et al. 2004) und wird, hier zwar nur teilweise, durch die verbesserte RNA Prozessierung mit PRE kompensiert (Kraunus, Schaumann et al. 2004; Schambach, Böhne et al. 2006; Schambach, Mueller et al. 2006). Dieser Verlust an Expressionsstärke ist ein großer Nachteil von SIN Vektoren, besonders für das Transgen maC46, wo die Expressionsrate die Effektivität stark beeinflusst.

6.4 Vergleich vom zellulären- und viralen-internen Promotor

In dieser Arbeit wurden SFFV Vektoren und humane EF1 α im SIN Design miteinander verglichen. Wie in anderen Studien beobachtet wurde, zeigten hier auch Vektoren mit viralem SFFV eine höhere Expressionsstärke als der zelluläre EF1 α Promotor (Abb 5.2.2, (Schambach, Böhne et al. 2006)). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass SFFV Promotoren mehr und dichter gepackte Bindungsstellen

für die Transkriptionsfaktoren besitzen als die zelluläre Promotoren (Zychlinski, Schambach et al. 2008). Der schwächere zelluläre EF1 α Promotor hat jedoch den Vorteil, dass er eine geringere Gefahr für eine Insertionsmutagenese darstellt (Thornhill, Schambach et al. 2008). Auch seine zelluläre Herkunft bietet angesichts der Biosicherheit einen Vorteil gegenüber dem viralen Promotor SFFV (Zychlinski, Schambach et al. 2008).

Andererseits ist aber für die Effektivität der Gentherapie die Expressionsstärke maßgebend. Die Wahl des optimalen internen Promotors ist eine Balance zwischen dem ungenügenden Gentherapieerfolg und der Insertionsmutagenese. Denn die Benutzung eines stärkeren Promotors, um erhöhte Expression anzutreiben, wird vom erhöhten Risiko einer Transaktivierung begleitet (Weber and Cannon 2007).

6.5 Einfluss vom Insulatorelement cHS4, SAR gegen Silencing der Genexpression

Der Prozess des Gensilencing ist wichtig für die natürliche Genregulation. Gene werden dabei durch verschiedene Modifikationen wie z.B. Methylierung in Heterochromatinformen überführt. Es ist aber für die Gentherapie nicht wünschenswert, dass das Transgen durch den Prozess des Silencing deaktiviert wird (Kass, Pruss et al. 1997). Um diese Positionseffekte zu vermeiden, wurden Elemente wie Insulator oder Matrix Attachment Region (MAR) eingeführt. Der Insulator kann den Positionseffekt bei transgenen Tieren verhindern, indem er die Methylierung der LTR verhindert oder verzögert (Rivella, Callegari et al. 2000). Der Insulator bildet ein Chromatin Loop aus und vermindert somit die Häufigkeit der Interaktion zwischen den Elementen (West and Fraser 2005).

Auch bei der Stammzelltherapie ist die Geninaktivierung ein signifikantes Problem (Swindle and Klug 2002). Die SAR verhindert aber die de novo Methylierung, wodurch es möglich wird, die Methylierung bedingte Repression vom Vektor zu verringern (Dang, Auten et al. 2000). Das SAR-Element bildet eine gesonderte Domäne, die nur beschränkt mit dem regulatorischen Element von außerhalb interagieren (Bode, Benham et al. 2000). In Kombination zeigten das Insulator- sowie das SAR-Element eine höhere Verstärkung der Expression als einzeln. Anscheinend kann diese

Kombination das Transgen in der hämatopoietischen Entwicklung in einer offenen Chromatindomäne halten (Ramezani, Hawley et al. 2003). Doch der Insulator verursacht eine Verringerung des Vektor Titers und zwar in Korrelation zur Größe des Inserts (Recillas-Targa, Valadez-Graham et al. 2004). Geringere Titer erschweren die Großproduktion der Vektorpartikel. Emery und Mitarbeiter aber beobachteten, dass das cHS4 Insulatorelement keinen Einfluss auf den Titer hatte (Emery, Yannaki et al. 2000). In dieser Arbeit zeigten Vektoren mit den Insulatorelementen sogar geringfügig höhere Titer als die zugehörigen Kontrollvektoren ohne den Insulator (Abb 5.2.1). Der Vektor mit dem SAR-Element zeigte zwar geringste Titer und Expressionsstärke, aber in Langzeitbeobachtung wies er eine relativ konstante Anzahl von transgenpositiven Zellen auf (Abb 5.4.1 B, Abb 5.5.1 B).

6.6 Langzeitexpression in vitro und in vivo

Für die erfolgreiche Gentherapie ist auch wichtig, dass das therapeutische Transgen für eine längere Zeit exprimiert wird. Dabei ist es notwendig, dass die transduzierten Zellen nicht absterben. Vielmehr ist es wünschenswert, dass diese sich vermehren. Ein selektiver Vorteil ist ein Faktor, der die Vermehrung der transgenen Zellen antreiben soll. In vitro zeigten die mit dem maC46 Vektor transduzierten Zellen effektiven Schutz gegen die HIV-Infektion und waren somit im Vorteil gegenüber nicht transduzierten Zellen (Egelhofer, Brandenburg et al. 2004). Das SAR-Element wurde eingeführt, um die Unterregulation der Transgenexpression in ruhenden T-Zellen zu verhindern (Cooper, Topp et al. 2004). Tatsächlich waren die mit SAR-Vektoren transduzierten Zellen länger im Blut nachweisbar als die mit anderen Vektoren transduzierten Zellen. Bei der Endanalyse zeigten die zugehörigen Mäuse eine hohe Anzahl der transgenpositiven T-Zellen in Lymphknoten (60% des Inputs). Trotz der geringen anfänglichen Titer bei der Transduktion blieb der transgenpositive Anteil über eine längere Zeit stabil. Das heißt, dass die genkorrigierten T-Zellen weiterhin das Wirkmittel, nämlich maC46, in die Membran exprimieren und von dem HIV geschützt werden. Der Schutz wird im Zusammenhang mit der HIV-Infektion zum selektiven Vorteil, wodurch der transgenpositive Anteil der T-Zellen in dessen Umgebung größer wird. Ein Nachteil der SAR-Elemente ist ihr negativer Einfluss auf die Titer, welcher eine Großproduktion erschwert.

Diese Daten und darausfolgende Schlussfolgerungen sind noch mit Vorbehalt zu betrachten. Denn die Anzahl der Tiere, die bei den Mausexperimenten benutzt wurden, sind zu wenig, um statistisch signifikante Daten zu gewinnen. Darüber hinaus gab es unvorgesehene Todesfälle der Mäuse, was die statische Unsicherheit nochmals verstärkt hat. Folglich muss für ein zuverlässiges Ergebnis die genannten Mausexperimente mit mehr Tieren wiederholt werden.

6.7 Ausblick

Durch die SIN Vektoren kann die Sicherheit der Gentherapie erhöht werden. Jedoch ist der Weg zur Gentherapie noch weit. Weitere Untersuchungen zielen auf lentiviralen Vektoren ab, beispielsweise die, die sich vom HIV-1 ableiten (Demaison, Parsley et al. 2002). Diese haben den Vorteil, dass sie auch ruhende Zellen infizieren können. In der SIN Konfiguration zeigten sie auch keine verschlechterten Titer oder Expressionsstärke (Schambach, Böhne et al. 2006). Ob sie wegen ihrer Herkunft ein erhöhtes Risiko tragen, wird noch diskutiert (Zufferey, Donello et al. 1999; Maruggi, Porcellini et al. 2009).

In dieser Studie zeigten die Insulatorelemente nicht die gewünschte Wirkung. Sie beeinflussten sowohl die Titer als auch die Expression negativ. In Studien, wo zwei Insulatorelemente eingebaut wurden, wurde jedoch eine Verstärkung der Expression beobachtet (Recillas-Targa, Valadez-Graham et al. 2004). Auch mit dem SAR-Element zusammen zeigten sie einen starken Schutz vor einem negativen Positionseffekt (Ramezani, Hawley et al. 2003).

Noch zu untersuchen wäre die Kombination vom wPRE mit der SAR und dem Insulatorelement. Die SAR und der Insulator verhindern die Methylierung und Silencing des Transgens, während wPRE die Prozessierung von RNA verbessert und somit die RNA Stabilität erhöht (Schambach, Böhne et al. 2006). Durch diese Maßnahme können die Titer sowie die Expression soweit erhöht werden, dass eine erfolgreiche Gentherapie auch mit einem schwachen Promotor möglich wird. Ein schwacher Promotor vermindert auch die Wahrscheinlichkeit der Insertionsmutationen (Weber and Cannon 2007). Wenn das Problem des Gensilencing behoben wird, eröffnet sich

auch die Möglichkeit der Stammzelltherapie, die bisher durch das methylationsbedingte Silencing verhindert war (Pannell and Ellis 2001; Schambach, Schiedlmeier et al. 2006).

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Agarwal, M., T. W. Austin, et al. (1998). "Scaffold attachment region-mediated enhancement of retroviral vector expression in primary T cells." J Virol **72**(5): 3720-8.
2. Allen, G. C., S. Spiker, et al. (2000). "Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing." Plant Mol Biol **43**(2-3): 361-76.
3. Anderson, J. S., S. Bandi, et al. (2006). "Derivation of normal macrophages from human embryonic stem (hES) cells for applications in HIV gene therapy." Retrovirology **3**: 24.
4. Arts, E. J. and M. A. Wainberg (1996). "Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription." Antimicrob Agents Chemother **40**(3): 527-40.
5. Auten, J., M. Agarwal, et al. (1999). "Effect of scaffold attachment region on transgene expression in retrovirus vector-transduced primary T cells and macrophages." Hum Gene Ther **10**(8): 1389-99.
6. Bahner, I., K. Kearns, et al. (1996). "Transduction of human CD34+ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture." J Virol **70**(7): 4352-60.
7. Baltimore, D. (1988). "Gene therapy. Intracellular immunization." Nature **335**(6189): 395-6.
8. Baltimore, D (1995). "Discovery of the Reverse Transcriptase" Faseb J **9**(15):1660-3.
9. Barbaro, G. (2006). "Highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: pathogenesis and cardiovascular risk." Am J Ther **13**(3): 248-60.
10. Barbaro, G. (2008). "Vascular injury, hypertension and coronary artery disease in human immunodeficiency virus infection." Clin Ter **159**(1): 51-5.
11. Baum, C., J. Dullmann, et al. (2003). "Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells." Blood **101**(6): 2099-114.
12. Baum, C., S. Hegewisch-Becker, et al. (1995). "Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells." J Virol **69**(12): 7541-7.
13. Baum, C., O. Kustikova, et al. (2006). "Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors." Hum Gene Ther **17**(3): 253-63.
14. Beard, B. C., D. Dickerson, et al. (2007). "Comparison of HIV-derived lentiviral and MLV-based gammaretroviral vector integration sites in primate repopulating cells."

Mol Ther **15**(7): 1356-65.

15. Bell, A. C. and G. Felsenfeld (1999). "Stopped at the border: boundaries and insulators." Curr Opin Genet Dev **9**(2): 191-8.
16. Berezney, R. and D. S. Coffey (1974). "Identification of a nuclear protein matrix." Biochem Biophys Res Commun **60**(4): 1410-7.
17. Bode, J., C. Benham, et al. (2000). "Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements)." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **10**(1): 73-90.
18. Briz, V., E. Poveda, et al. (2006). "HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways." J Antimicrob Chemother **57**(4): 619-27.
19. Buchschacher, G. L., Jr., E. O. Freed, et al. (1995). "Effects of second-site mutations on dominant interference by a human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutant." J Virol **69**(2): 1344-8.
20. Buchschacher, G. L., Jr. and F. Wong-Staal (2000). "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases." Blood **95**(8): 2499-504.
21. Bushman, F. D. (2007). "Retroviral integration and human gene therapy." J Clin Invest **117**(8): 2083-6.
22. Caruso, M., B. Salomon, et al. (1995). "Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription." Virology **206**(1): 495-503.
23. Chazal, N. and D. Gerlier (2003). "Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 226-37, table of contents.
24. Chen, Z., P. Zhou, et al. (1997). "Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry." J Virol **71**(4): 2705-14.
25. Cheng-Mayer, C., D. Seto, et al. (1988). "Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host." Science **240**(4848): 80-2.
26. Chung, J. H., A. C. Bell, et al. (1997). "Characterization of the chicken beta-globin insulator." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 575-80.
27. Coffin, J. M., S. H. Hughes, et al. (1997). Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press
28. Cooper, L. J., M. S. Topp, et al. (2004). "Enhanced transgene expression in quiescent and activated human CD8+ T cells." Hum Gene Ther **15**(7): 648-58.
29. Copeland, K. F. (2006). "Inhibition of HIV-1 entry into cells." Recent Pat Antiinfect Drug Discov **1**(1): 107-12.
30. Cordelier, P. and D. S. Strayer (2003). "Mechanisms of alpha1-antitrypsin inhibition of cellular serine proteases and HIV-1 protease that are essential for HIV-1 morphogenesis." Biochim Biophys Acta **1638**(3): 197-207.

31. Costin, J. M. (2007). "Cytopathic mechanisms of HIV-1." Virology **4**: 100.
32. Dang, Q., J. Auten, et al. (2000). "Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector." J Virol **74**(6): 2671-8.
33. Daniel, R. and J. A. Smith (2008). "Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences." Hum Gene Ther **19**(6): 557-68.
34. De Clercq, E. (2009). "Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV." Int J Antimicrob Agents **33**(4): 307-20.
35. Demaison, C., K. Parsley, et al. (2002). "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter." Hum Gene Ther **13**(7): 803-13.
36. Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
37. Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.
38. Egelhofer, M., G. Brandenburg, et al. (2004). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides." J Virol **78**(2): 568-75.
39. Emery, D. W., H. Chen, et al. (1998). "Development of a condensed locus control region cassette and testing in retrovirus vectors for A gamma-globin." Blood Cells Mol Dis **24**(3): 322-39.
40. Emery, D. W., E. Yannaki, et al. (2002). "Development of virus vectors for gene therapy of beta chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces gamma-globin gene silencing in vivo." Blood **100**(6): 2012-9.
41. Emery, D. W., E. Yannaki, et al. (2000). "A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9150-5.
42. Flasshove, M., W. Bardenheuer, et al. (2000). "Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene." J Cancer Res Clin Oncol **126**(7): 391-9.
43. Forth, W., D. Henschler, et al. (10.Aufl. 2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier.
44. Fraisier, C., A. Irvine, et al. (1998). "High level inhibition of HIV replication with combination RNA decoys expressed from an HIV-Tat inducible vector." Gene Ther **5**(12): 1665-76.
45. Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annu Rev Biochem **67**: 1-25.
46. Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in

- acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-7.
47. Gallo, S. A., C. M. Finnegan, et al. (2003). "The HIV Env-mediated fusion reaction." Biochim Biophys Acta **1614**(1): 36-50.
 48. Gelderblom, H. R. (1991). "Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function." Aids **5**(6): 617-37.
 49. Gottlieb, M. S., R. Schroff, et al. (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." N Engl J Med **305**(24): 1425-31.
 50. Grinsztejn, B., B. Y. Nguyen, et al. (2007). "Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial." Lancet **369**(9569): 1261-9.
 51. Gulick, R. M., J. Lalezari, et al. (2008). "Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection." N Engl J Med **359**(14): 1429-41.
 52. Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
 53. Haseltine, W. A. (1991). "Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1." Faseb J **5**(10): 2349-60.
 54. Hermann, F. G., H. Martinius, et al. (2009). "Protein scaffold and expression level determine antiviral activity of membrane-anchored antiviral peptides." Hum Gene Ther **20**(4): 325-36.
 55. Hildinger, M., K. L. Abel, et al. (1999). "Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use." J Virol **73**(5): 4083-9.
 56. Hildinger, M., M. T. Dittmar, et al. (2001). "Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry." J Virol **75**(6): 3038-42.
 57. Holstein, A., A. Plaschke, et al. (2001). "Lipodystrophy and metabolic disorders as complication of antiretroviral therapy of HIV infection." Exp Clin Endocrinol Diabetes **109**(8): 389-92.
 58. Huang, C. C., S. N. Lam, et al. (2007). "Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4." Science **317**(5846): 1930-4.
 59. Jacobson, J. M., R. J. Israel, et al. (2004). "Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542." Antimicrob Agents Chemother **48**(2): 423-9.
 60. Janowska-Wieczorek, A., M. Majka, et al. (2001). "Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment." Blood **98**(10): 3143-9.
 61. Karpas, A. (2004). "Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology." Biol Rev Camb Philos Soc **79**(4): 911-33.
 62. Kass, S. U., D. Pruss, et al. (1997). "How does DNA methylation repress

- transcription?" Trends Genet **13**(11): 444-9.
63. Kilby, J. M., S. Hopkins, et al. (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nat Med **4**(11): 1302-7.
64. Kitamura, Y., T. Ishikawa, et al. (1999). "Inhibition of replication of HIV-1 at both early and late stages of the viral life cycle by single-chain antibody against viral integrase." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **20**(2): 105-14.
65. Klasse, P. J., M. M. Rosenkilde, et al. (1999). "CD4-Chemokine receptor hybrids in human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **73**(9): 7453-66.
66. Korber, B., M. Muldoon, et al. (2000). "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains." Science **288**(5472): 1789-96.
67. Kraunus, J., D. H. Schaumann, et al. (2004). "Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing." Gene Ther **11**(21): 1568-78.
68. Kuritzkes, D. R., J. Jacobson, et al. (2004). "Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1." J Infect Dis **189**(2): 286-91.
69. Kurre, P., J. Morris, et al. (2003). "Scaffold attachment region-containing retrovirus vectors improve long-term proviral expression after transplantation of GFP-modified CD34+ baboon repopulating cells." Blood **102**(9): 3117-9.
70. Li, Z., J. Dullmann, et al. (2002). "Murine leukemia induced by retroviral gene marking." Science **296**(5567): 497.
71. Lund, O., O. S. Lund, et al. (1997). "Gene therapy of T helper cells in HIV infection: mathematical model of the criteria for clinical effect." Bull Math Biol **59**(4): 725-45.
72. Markowitz, M., B. Y. Nguyen, et al. (2007). "Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study." J Acquir Immune Defic Syndr **46**(2): 125-33.
73. Maruggi, G., S. Porcellini, et al. (2009). "Transcriptional enhancers induce insertional gene deregulation independently from the vector type and design." Mol Ther **17**(5): 851-6.
74. Mautino, M. R. and R. A. Morgan (2000). "Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by conditionally replicating human immunodeficiency virus-based lentiviral vectors expressing envelope antisense mRNA." Hum Gene Ther **11**(14): 2025-37.
75. Miller, A. D., D. G. Miller, et al. (1993). "Use of retroviral vectors for gene transfer and expression." Methods Enzymol **217**: 581-99.
76. Miyoshi, H., U. Blomer, et al. (1998). "Development of a self-inactivating lentivirus vector." J Virol **72**(10): 8150-7.
77. Modlich, U., J. Bohne, et al. (2006). "Cell-culture assays reveal the importance of

- retroviral vector design for insertional genotoxicity." Blood **108**(8): 2545-53.
78. Modlich, U., O. S. Kustikova, et al. (2005). "Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis." Blood **105**(11): 4235-46.
79. Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-77.
80. Montagnier, L. (2002). "Historical essay. A history of HIV discovery." Science **298**(5599): 1727-8.
81. Moreno-Carranza, B., M. Gentsch, et al. (2009). "Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells." Gene Ther **16**(1): 111-8.
82. Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
83. Newrzela, S., K. Cornils, et al. (2008). "Resistance of mature T cells to oncogene transformation." Blood **112**(6): 2278-86.
84. Palu, G., C. Parolin, et al. (2000). "Progress with retroviral gene vectors." Rev Med Virol **10**(3): 185-202.
85. Pannell, D. and J. Ellis (2001). "Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors." Rev Med Virol **11**(4): 205-17.
86. Pereira, L. A., K. Bentley, et al. (2000). "A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter." Nucleic Acids Res **28**(3): 663-8.
87. Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, et al. (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7415-9.
88. Prioleau, M. N., M. C. Gendron, et al. (2003). "Replication of the chicken beta-globin locus: early-firing origins at the 5' HS4 insulator and the rho- and betaA-globin genes show opposite epigenetic modifications." Mol Cell Biol **23**(10): 3536-49.
89. Ramezani, A., T. S. Hawley, et al. (2003). "Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator." Blood **101**(12): 4717-24.
90. Recillas-Targa, F., V. Valadez-Graham, et al. (2004). "Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis." Bioessays **26**(7): 796-807.
91. Rivella, S., J. A. Callegari, et al. (2000). "The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites." J Virol **74**(10): 4679-87.
92. Rusconi, S., A. Scozzafava, et al. (2007). "An update in the development of HIV entry inhibitors." Curr Top Med Chem **7**(13): 1273-89.
93. Sahlberg, C., R. Noreen, et al. (1998). "Synthesis and anti-HIV activities of urea-

- PETT analogs belonging to a new class of potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **8**(12): 1511-6.
94. Schambach, A., J. Bohne, et al. (2006). "Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression." Gene Ther **13**(7): 641-5.
95. Schambach, A., J. Bohne, et al. (2006). "Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells." Mol Ther **13**(2): 391-400.
96. Schambach, A., M. Galla, et al. (2007). "Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors." Mol Ther **15**(6): 1167-73.
97. Schambach, A., D. Mueller, et al. (2006). "Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors." Gene Ther **13**(21): 1524-33.
98. Schambach, A., B. Schiedlmeier, et al. (2006). "Towards hematopoietic stem cell-mediated protection against infection with human immunodeficiency virus." Gene Ther **13**(13): 1037-47.
99. Schröder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-9.
100. Schübeler, D., C. Mielke, et al. (1996). "Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner." Biochemistry **35**(34): 11160-9.
101. Schweizer, M., E. Flory, et al. (2001). "Retroviral Vectors." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **44**(Gentherapie: Forschung, Entwicklung und Regulation): 1038-1046.
102. Shaheen, F., L. Duan, et al. (1996). "Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle." J Virol **70**(6): 3392-400.
103. Sinn, P. L., S. L. Sauter, et al. (2005). "Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production." Gene Ther **12**(14): 1089-98.
104. Swindle, C. S. and C. A. Klug (2002). "Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors." J Hematother Stem Cell Res **11**(3): 449-56.
105. Thornhill, S. I., A. Schambach, et al. (2008). "Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency." Mol Ther **16**(3): 590-8.
106. Thrasher, A. J., H. B. Gaspar, et al. (2006). "Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity." Nature **443**(7109): E5-6; discussion E6-7.
107. van Lunzen, J., T. Glaunsinger, et al. (2007). "Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus." Mol Ther **15**(5): 1024-33.
108. Vermeire, K., J. Brouwers, et al. (2008). "CADA, a potential anti-HIV microbicide that

- specifically targets the cellular CD4 receptor." Curr HIV Res **6**(3): 246-56.
109. Vocero-Akbani, A. M., N. V. Heyden, et al. (1999). "Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein." Nat Med **5**(1): 29-33.
110. Vogt, P. K. and S. S. Hu (1977). "The genetic structure of RNA tumor viruses." Annu Rev Genet **11**: 203-38.
111. von Laer, D. and G. Brandenburg (2001). "Gene Therapy for HIV Infection by "Intracellular Immunization" with Antiviral Genes." AIDS REVIEW **3**(3): 169-177.
112. von Laer, D., S. Hasselmann, et al. (2006). "Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work?" J Gene Med **8**(6): 658-67.
113. von Laer, D., S. Hasselmann, et al. (2006). "Impact of gene-modified T cells on HIV infection dynamics." J Theor Biol **238**(1): 60-77.
114. Weber, E. L. and P. M. Cannon (2007). "Promoter choice for retroviral vectors: transcriptional strength versus trans-activation potential." Hum Gene Ther **18**(9): 849-60.
115. Wei, X., J. M. Decker, et al. (2002). "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1896-905.
116. Werner, M., J. Kraunus, et al. (2004). "B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element." Gene Ther **11**(12): 992-1000.
117. West, A. G. and P. Fraser (2005). "Remote control of gene transcription." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R101-11.
118. Wong-Staal, F. (1991). "The AIDS virus. What we know and what we can do about it." West J Med **155**(5): 481-7.
119. Wu, X., Y. Li, et al. (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-51.
120. Yam, P. Y., S. Li, et al. (2002). "Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells." Mol Ther **5**(4): 479-84.
121. Yoder, J. A., N. S. Soman, et al. (1997). "DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe." J Mol Biol **270**(3): 385-95.
122. Zahn, R. C., F. G. Hermann, et al. (2008). "Efficient entry inhibition of human and nonhuman primate immunodeficiency virus by cell surface-expressed gp41-derived peptides." Gene Ther **15**(17): 1210-22.
123. Zufferey, R., J. E. Donello, et al. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol **73**(4): 2886-92.
124. Zychlinski, D., A. Schambach, et al. (2008). "Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors." Mol Ther.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AIDS	„Acquired immunodeficiency syndrome“
Amp	Ampicillin
AT	Nukleotid Adenosin und Tymidin
°C	Grad Celsius
C46	Konsensussequenz des T-20 und C34 aus C-terminaler Haptadwiederholung
ca.	circa
CA	Capsid Protein
CCR5	Chemokine rezeptor (Co-Rezeptoren für HIV)
CD	„Cluster of differentiation“
CDAD	Cyclotriazadisulfonamide
CD4	Oberflächenrezeptor, Rezeptor für HIV
CD8	Oberflächenrezeptor von zytotoxische T-Zellen
chS4	chicken Hypersensitive Site
cm	Zentimeter
CXCR4	Chemokin rezeptor (Co-Rezeptoren für HIV)
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
E. coli	„Escherichia coli“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 alpha
Env	Hüllprotein (Envelope)
FACS	Fluoreszenaktivierte Zellsortierung („Fluorescence activated cell sorting“)
FCS	Fetales Kalberserum („fetal calf serum“)
g	Gravitationskonstante

gag	Gruppenspezifisches Antigen
GALV	„Gibbon ape leukemia virus“
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
gp41	41 kDa großes Transmembranglykoprotein von HIV-1
gp120	120 kDa großes peripheres Glykoprotein von HIV-1
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	Heptadwiederholung („heptad repeat“)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	Interne Ribosomen Eintrittsstelle („internal ribosomal entry site“)
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LCR	„Locus Controll Region“
LNGFR	„Low affinity nerval growth factor receptor“
LTR	Lange terminale Wiederhohlungssequenz („long terminal repeat“)
M	Molar
MAR	Matrix attachment Region
MCS	„multiple cloning site“
min	Minute
Mio	Millionen
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MLV	Maus-Leukämievirus
mM	millimol
ml	milliliter
µl	mikroliter
MPSV	Myeloproliferatives Sarcoma Virus
MSA	Maus Serum Albumin
mRNA	messenger RNA
MSD	Transmembrandomäne („Membrane spanning domain“)

MOI	„multiplicity of infection“
Nef	HIV-Regulatorprotein („negative factor“)
ng	Nanogramm
neo	Neomycinresistenzgen
Ori	Replikationsursprung („Origin“)
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBMC	Periphere mononukleare Zellen der Blutbahn
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
Pol	Polymerase
REV	„regulator of expression of virion proteins“
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RRE	Rev-responsive element
S	Signalpeptid von LNGFR
s	Sekunde
SAR	Scaffold Attachment Region
SFFV	“Spleen Focus-Forming Virus”
SIN	„self inactivating“
SIV	Simian Immundefizienzvirus (“Simian Immunodeficiency Virus”)
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	transactivator of transcription
Tris	Trishydroaminomethan
U	Enzymeinheit („Units“)
U/min	Umdrehungen pro Minute
USE	„upstream sequential element“
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
Vif	HIV-1 Protein („viral infectivity factor“)
VSV-G	„vesicular stomatitis virus glycoprotein
Vpr	HIV-1 Protein („viral protein R“)
Vpu	HIV-1 Protein („Viral Protein U“)
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen („volume per volume“)

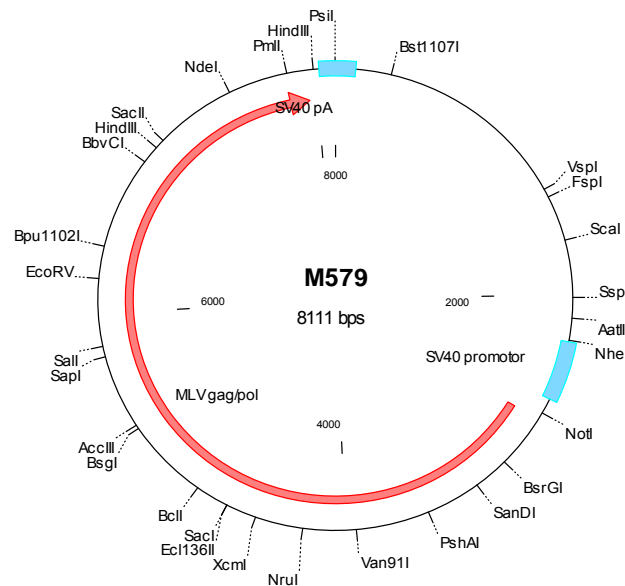
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen („weight per volume“)
wPRE	woodchuck posttranscriptional regulatory element
WHO	World Health Organisation

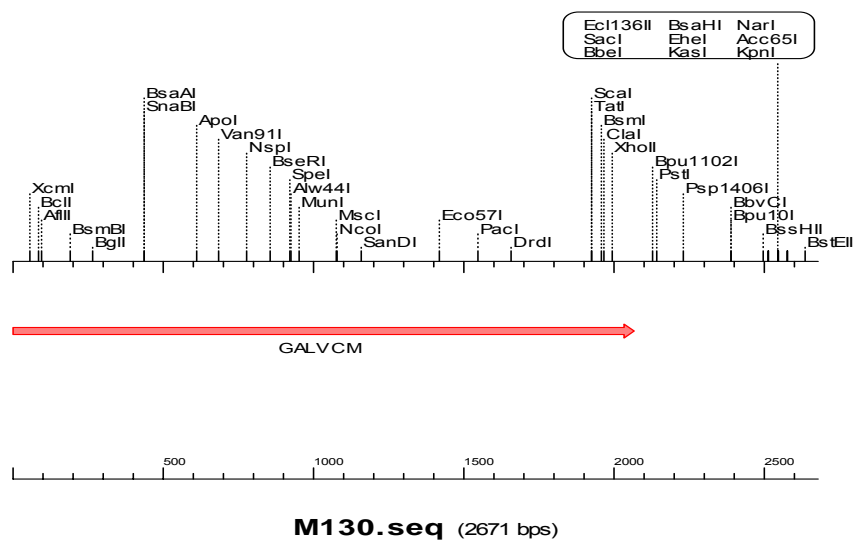
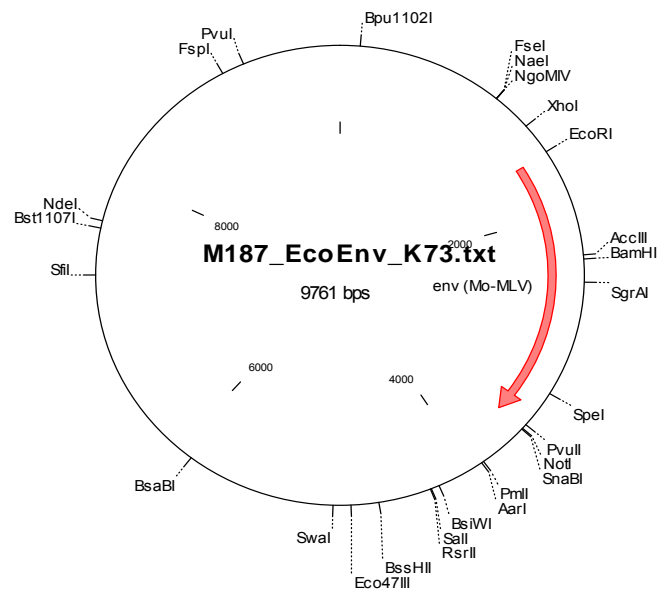
7.3 Abbildungsverzeichnis

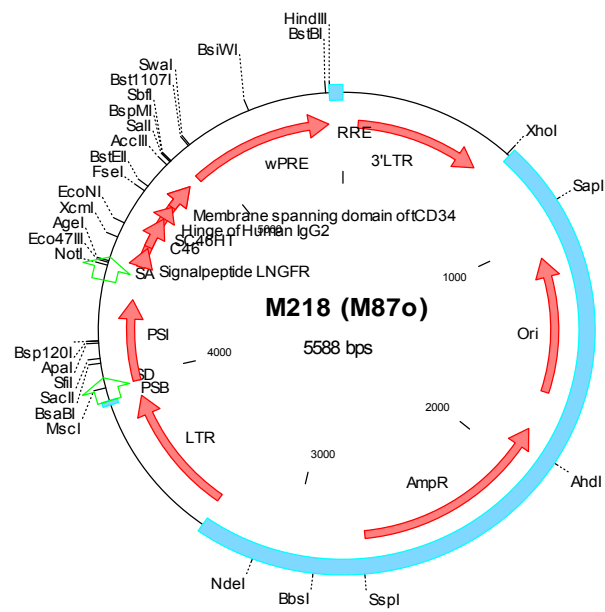
- Abb 2.1 Epidemie der HIV-Infektion 2007
- Abb 2.2 Schematische Darstellung der Struktur von HIV und des Genoms
- Abb 2.3 Replikationszyklus des Retrovirus HIV-1 und Wirkort der wichtigen Medikamentengruppen
- Abb 2.4 Fusionsprozess und C-Peptidaktion
- Abb 2.5 Der retrovirale Vektor M87o exprimiert einen Fusionsinhibitor
- Abb 2.6 Aufbau und Replikationszyklus von SIN Vektoren
- Abb 5.1 Schematische Darstellung der verwendeten SIN Vektoren und des Kontrollvektors M87o
- Abb 5.2.1 Vergleich der Vektortiter
- Abb 5.2.2 Vergleich der Expressionsstärke der Vektoren in PM1 Zellen
- Abb 5.3.1 Langzeitverlauf transgenpositiver Zellen in primären humanen T-Zellen
- Abb 5.3.2 Langzeitverlauf der Expressionsstärke des maC46-Peptids in primären humanen T-Zellen
- Abb 5.4.1 Die Expressionsstärke der verschiedenen Vektoren nach der Transduktion von SC-1 Zellen
- Abb 5.4.2 FACS-Bilder der murinen T-Zellen und die Expressionsstärke der Vektoren in murinen T-Zellen
- Abb 5.5.1 Verlauf der Transgenexpression in den transplantierten Mäusen über den Zeitraum von 60 Tagen
- Abb 5.5.2 Endanalyse der T-Zell transplantierten Mäuse

7.4 Plasmidenkarten

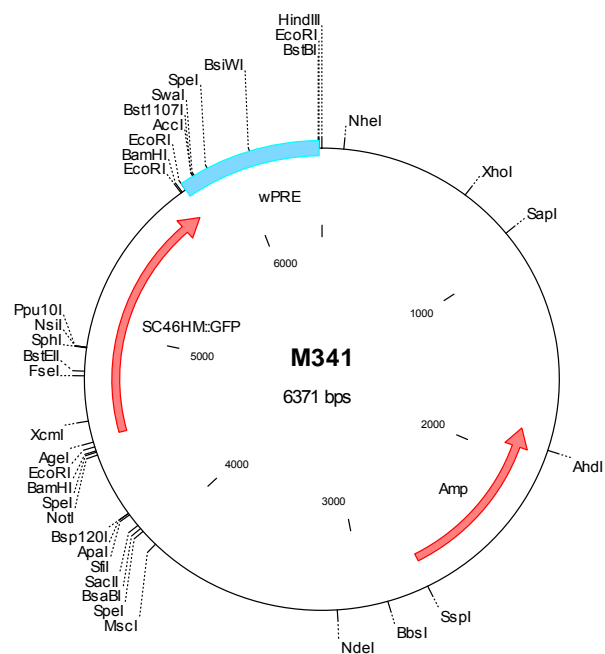
Im Folgenden sind die verwendeten Plasmidenkarten dieser Arbeit aufgeführt. Die Darstellungsweise der Karten ist für jedes Konstrukt identisch: Rote Pfeile markieren Gene und blaue Bereiche stellen wichtige Sequenzelemente dar. Bei allen Konstrukten sind die singulären Restriktionsschnittstellen hervorgehoben. Folgende Abkürzungen werden in den Karten verwendet: Amp: Ampicillinresistenzgen; eGFP: *enhanced green fluorescent protein*, gag: Gruppenspezifische Antigene, IRES: *internal ribosome entry site*, LTR: *long terminal repeats*, ma: membrangebunden, MCS: *multiple cloning site*, neo: Neomycinresistenzgen, Ori: Replikationsursprung, pol: Polymerase, Rev: *Regulator of expression of virion proteins*, RRE: *Rev responsive element*, SFFV: *Spleen focus-forming virus*, SIN: *self inactivating*, SV40: *simian virus 40*, Tat: *transactivator of transcription*, wPRE: *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*.



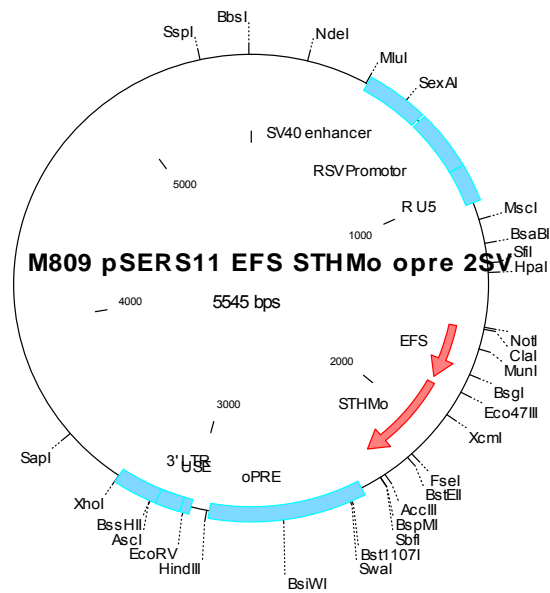




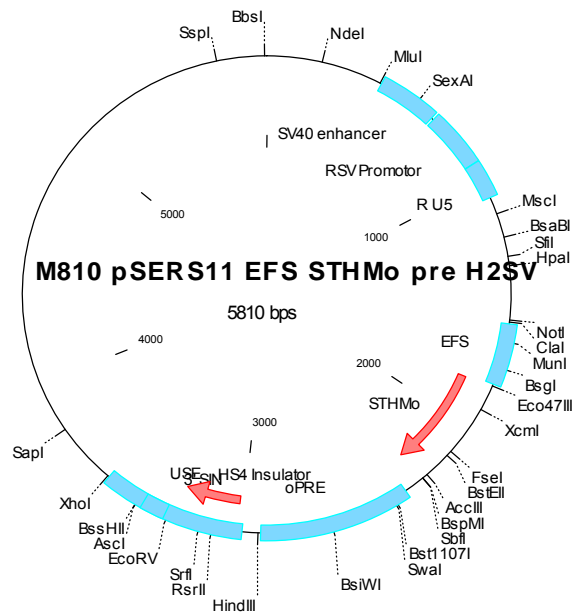
MP71-GFP



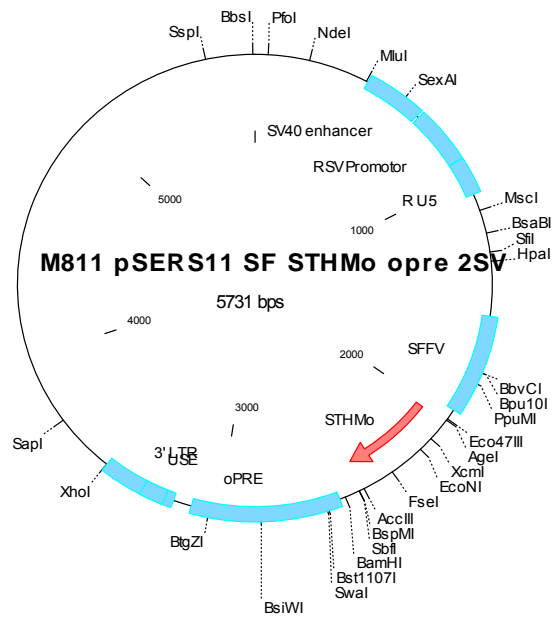
EF-C46



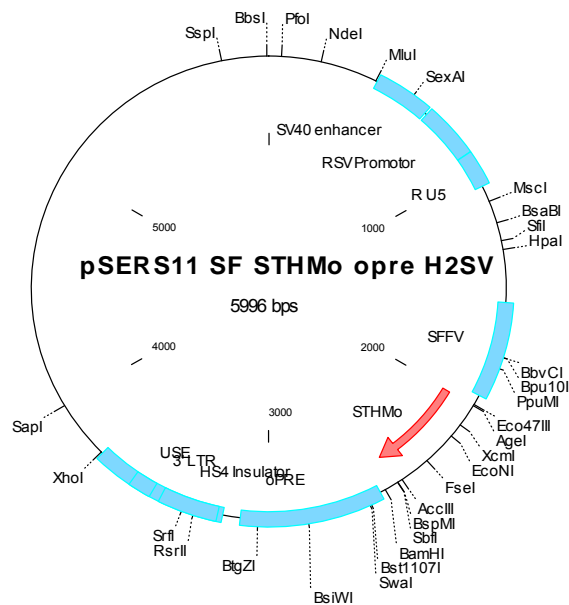
EF-C46-In



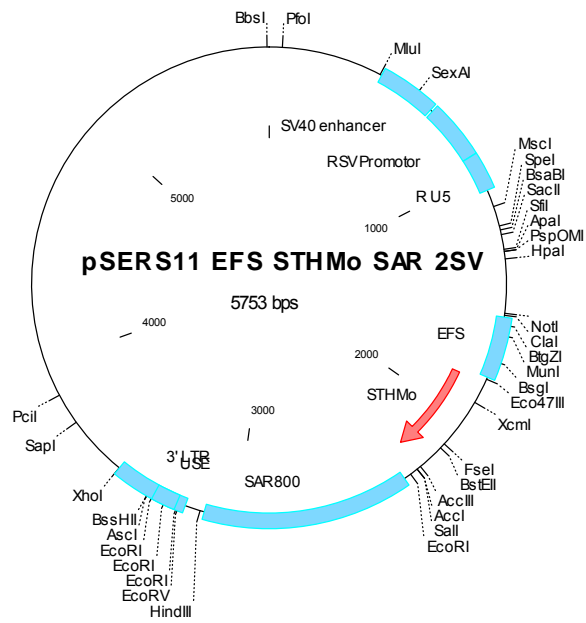
SF-C46



SF-C46-In



EF-C46-Sa



8 Summary

In order to achieve a successful gene therapy, the transgene has to be integrated in as many cells as possible and kept active by an efficient gene transfer system. Furthermore there has to be a selective advantage of gene-modified cells compared to native cells to augment the percentage of protected cells. At the same time the safety cannot be disregarded, since an adverse integration of a transgene may lead to insertional mutagenesis and thereby induce tumors.

The vector M87o developed in the workgroup of Dorothee von Laer encodes a membrane anchored fusion inhibitor maC46 (membrane anchored C-Peptide 46), which effectively inhibits the entry of HIV (human immunodeficiency virus) into target cells. This gene therapy with M87o has passed a clinical trial with T lymphocytes of 10 patients with advanced AIDS (acquired immune deficiency syndrome). The therapy was safe and no toxicity was observed in the patients. However, the therapy had no significant benefit for the patients.

In this study SIN vectors (self inactivating vectors) were tested in 5 different configurations, in order to find the optimal vector design for a gene therapy with maC46 and enable a high long-term expression of retroviral SIN vectors in T lymphocytes. SIN vectors are regarded as a safer vector system due to the lower risk of insertional mutagenesis compared to conventional gamma retroviral vectors. To obtain better transgene expression, SIN vectors have either a cellular promoter or a viral SFFV (spleen focus forming virus) promoter as an internal promoter. In addition, regulatory elements like wPRE (woodchuck posttranscriptional regulatory element), cHS4 (chicken Hypersensitive site) insulator and SAR (scaffold attachment region) element were integrated into some of the vectors. These elements should lead to a higher and a long-lasting transgene expression. wPRE improves RNA processing and stability, whereas SAR and cHS4 insulator counteract the silencing of transgene and maintain the expression.

These 5 SIN vectors were compared to each other and to the conventional gamma retroviral vector M87o in terms of titers, expression rate and long term gene expression. For this propose, the human T cell line PM-1 and primary human T cells were used as test cells. The experiments were then repeated with murine T cells,

which were later transplanted into immune deficient mice to follow the gene expression in vivo.

The SIN vectors showed significantly weaker transgene expression than LTR (long terminal repeat) driven vectors and only one combination with the viral promoter and wPRE showed an expression nearly as high as for the M87o vector.

While the viral SFFV promoter had higher expression rate than cellular EF1 α (Elongation factor 1 alpha) promoter, cHS4 insulator only minimally affected titer and expression rate. The vector with SAR element had the lowest titer and expression rate, but held a relatively constant amount of transgene positive cells in the long term experiment.

SIN Vectors, in which RNA processing is improved and methylation dependant silencing is inhibited with a combination of wPRE and SAR element, may be a further possibility of optimization of gene transfer system for the gene therapy.

Lebenslauf

Name: Ryou
Vorname: So Young
Geburtstag: 12. Februar 1959
Geburtsort: Kwangju-si, Südkorea
Familienstand: verheiratet, 4 Kinder

Schul Ausbildung in Korea

03.1966 - 02.1977 Grundschole, Mittelschole und Gymnasium in Kwangju-si, Abschluss: Abitur

03.1977 - 02.1985 Studium der Pharmazie an der Cho-Sun Universität
21.03.1985 Approbation als Apothekerin

03.1985 - 02.1997 Weiterbildung von chinesischer Medizin
11.06.1996 Approbation für chinesische Arzneibereitung erhalten

01.03.1998 - 31.07.2000 Weiterbildung Sozial Pharmazie an der Chung- Ang Universität, Abschluss mit Master

Berufliche Erfahrungen in Korea

03.1985 - 09.1985 Arbeit in der Apothekenabteilung des Chonnam Krankenhaus

09.1985 - 07.2000 Leitung einer eigenen Apotheke

Leben in Deutschland

01.08.2000 – 30.09.2002 Beginn des Aufenthalts in Deutschland, Deutschkurse
01.10.2002 – 07. 2004 Studium der Zahnmedizin an der Universität Frankfurt am Main

01.10.2004 – 07. 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Frankfurt am Main

09.09.2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung nach neuer ÄappO, Note „ gut“

26.11.2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung nach neuer ÄappO, Note „ gut“

Promotion

03.01.2007 – 12.2009 Doktorandin am Georg Speyer Haus, Frankfurt am Main, Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. D.von Laer

So Young Ryou

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Funktionelle Analyse von retroviralen SIN Vektoren in T-Zellen“

im Georg Speyer Haus (Chemotherapeutisches Forschungsinstitut) unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Dorothee von Laer mit Unterstützung durch Herrn Dr. Felix Günter Hermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Dietzenbach, den 07. Januar 2010

So Young Ryou